

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho Acadêmico

Avaliação da toxicidade aguda de Irgarol 1051 e
Diuron sobre o copépodo calanóide *Acartia tonsa*

Lucas Freitas Cordeiro

Pelotas, 2008

Lucas Freitas Cordeiro

**Avaliação da toxicidade aguda de Irgarol 1051 e Diuron sobre o copépodo
calanóide *Acartia tonsa***

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Gilberto Fillmann

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Dr. Gilberto Fillmann (Orientador)

Dra. Grasiela Lopes Leães Pinho

Msc. Luís Alberto Echenique Dominguez

Msc. Ítalo Braga de Castro

RESUMO

CORDEIRO, Lucas Freitas. **Avaliação da toxicidade aguda de Irgarol 1051 e Diuron sobre o copépodo calanóide *Acartia tonsa***. 2008. 31f. Trabalho Acadêmico – Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os anti-incrustantes são substâncias fundamentais na prevenção da bioincrustação por organismos aquáticos em superfícies submersas, mas apresentam toxicidade contra organismos não alvo e podem ser ambientalmente cumulativos. Os dados provenientes de estudos toxicológicos desses compostos sobre a biota permitem entender a ação das substâncias e o comportamento das espécies afetadas, sendo fundamentais na tomada de ações sóbrias na busca da melhoria da qualidade ambiental. O presente estudo focou na análise da toxicidade de dois dos biocidas anti-incrustantes mais utilizados no mundo, Irgarol 1051 e Diuron, sobre um organismo cosmopolita importante na ciclagem de energia e nutrientes e na ligação trófica entre produção primária e terciária dos ecossistemas marinhos, o copépodo calanóide eurialino *Acartia tonsa*. Os testes realizados foram ensaios estáticos de 48h, salinidade 30 e fotoperíodo 12C:12E. As faixas de concentração utilizadas foram de $1\mu\text{g L}^{-1}$ a $1000\mu\text{g L}^{-1}$. A LC_{50} encontrada para Irgarol 1051 e Diuron foram de $28,13\mu\text{g L}^{-1}$ e $17,18\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Essas concentrações são mais altas que as concentrações comumente detectadas em muitas marinas e zonas de alto fluxo de embarcações, áreas essas possuidoras de altas concentrações de biocidas anti-incrustantes. A repetição destes testes e a realização de ensaios crônicos se fazem necessárias em vista de se montar um quadro mais completo em relação à toxicidade de Irgarol 1051 e Diuron sobre a espécie.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, *Acartia tonsa*, Irgarol, Diuron, Anti-incrustantes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula estrutural do Irgarol 1051.....	13
Figura 2	Fórmula estrutural do Diuron.....	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxa de sobrevivência de <i>A. tonsa</i> em DSS, após 48h de exposição.....	19
Tabela 2	Taxa de sobrevivência de <i>A. tonsa</i> em acetona, após 48 horas de exposição.....	20
Tabela 3	Taxa de sobrevivência de <i>A. tonsa</i> em etanol, após 48 horas de exposição.....	20
Tabela 4	Taxa de sobrevivência de <i>A. tonsa</i> em Irgarol 1051, após 48h de exposição.....	20
Tabela 5	Taxa de sobrevivência de <i>A. tonsa</i> em Diuron, após 48h de exposição.....	21
Tabela 6	Valores de toxicidade aguda de DSS sobre <i>A. tonsa</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$).....	22
Tabela 7	Comparação da toxicidade de Diuron e Irgarol 1051.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:.....	9
2.1. AGENTES ANTI-INCRUSTANTES (HISTÓRICO).....	9
2.2. A ATUALIDADE	11
2.3. COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTUDO	12
2.3.1. Irgarol 1051	12
2.3.2. Diuron.....	14
2.4. ORGANISMO-TESTE.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. CULTIVO DE <i>Acartia tonsa</i>	16
3.2. CULTIVO DE <i>Thalassiosira weissflogii</i> E <i>Isochrysis galbana</i>	17
3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EXPOSIÇÃO.....	17
3.4. LAVAGEM DO MATERIAL UTILIZADO.....	17
3.5. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. ENSAIO COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	19
4.2. ENSAIOS COM SOLVENTES.....	20
4.3. ENSAIO TOXICOLÓGICO COM IRGAROL 1051	20
4.4. ENSAIO TOXICOLÓGICO COM DIURON	21
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO:	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	25

1. INTRODUÇÃO

Produtos químicos anti-incrustantes possuem função fundamental na navegação mundial. São compostos de ação biocida adicionados às tintas usadas na pintura dos cascos de embarcações, com o objetivo de impedir o aderimento e crescimento de organismos vivos, possuindo um importante papel econômico e mesmo ambiental. (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Infelizmente, tais biocidas possuem ação tóxica contra organismos não alvo e altas concentrações em coluna d'água e sedimento têm sido encontradas ao redor do mundo (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004). Por esse motivo, governos de muitos países providenciaram medidas legais contra os produtos em uso como forma de tentar reverter esse quadro. Estas medidas englobam desde restrições da sua aplicação em relação ao comprimento das embarcações, até a total proibição do uso do produto como agente anti-incrustante. Os dados necessários para gerar esse tipo de ação, em parte provêm de estudos ecotoxicológicos que permitem a avaliação do efeito dos compostos tóxicos das tintas anti-incrustantes à biota, o que permite que governos possam tomar decisões sóbrias quanto ao uso de cada um deles (CASTRO *et al.*, 2006). Esses estudos têm caráter regional e dados relativos às espécies nativas de cada região são necessários para a implantação de uma legislação condizente com a realidade ecológica de cada local. As pesquisas quanto à toxicidade dos compostos anti-incrustantes navais permitem que se possam delinear limites seguros quanto ao uso de cada substância, buscando a proteção do meio ambiente sem desprezar a importância econômica e mesmo ambiental intrínseca ao uso desses compostos. Na América do Sul, estudos desta natureza ainda são escassos e, possivelmente por isso, legislações relacionadas a agentes anti-incrustantes praticamente inexistem. Somente recentemente o tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT), anti-incrustantes clássicos que atualmente são proibidos em muitos países e estão em via de um banimento mundial (IMO, 2008), foram incluídos na legislação brasileira (Resolução CONAMA 357/2005). Entretanto, ainda não existem leis voltadas exclusivamente ao controle de uso dos anti-incrustantes ou sequer há perspectiva de inclusão dos novos compostos utilizados na legislação ambiental. No Brasil, a quantidade de pesquisas referentes à toxicidade desses compostos é pífia e sua necessidade cada vez mais urgente.

Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade aguda dos biocidas Irgarol 1051 e Diuron, compostos utilizados em tintas como agentes anti-incrustantes, sobre o copépodo eurialino *Acartia tonsa* (DANA, 1849) em ensaio de caráter estático e com duração de 48h.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1. Agentes anti-incrustantes (histórico)

Muitos organismos fazem parte da biota incrustante. Entre eles estão inseridos muitos tipos de algas, acídias, cracas e outros organismos que representaram os grandes algozes de tempos passados, como os moluscos dos gêneros *Martesia* (família *Pholadidae*) e *Teredo*, (família *Teredinidae*), que possuem o hábito de perfurar a madeira (DESIMONE e ROLLAND, 2003). A incrustação de organismos pode levar, em casos mais extremos, a deterioração do casco por corrosão. Muito antes de a corrosão ocorrer, no entanto, o casco atacado pelos organismos tem sua hidrodinâmica afetada, dificultando a manobrabilidade da embarcação (DESIMONE e ROLLAND, 2003; LUDGATE, 1987) e, conseqüentemente, aumentando o seu consumo de combustível. Uma camada de 1 mm de espessura de algas, por exemplo, aumenta a fricção do casco com a água em até 80% e causa uma perda de velocidade da embarcação de cerca de 15%. Uma camada de apenas 100 µm de organismos incrustados pode ser responsável pela elevação de até 6% no consumo de combustível, e chegar a até 30% em casos de incrustação mais severa (LIU *et al.*, 1997). Esse é um dado economicamente alarmante, tendo em vista que o combustível representa aproximadamente metade dos custos do transporte marítimo (CHAMP, 2000). Desta forma, a necessidade do uso de substâncias ou materiais que prevenissem a incrustação por organismos vivos, a chamada “bioincrustação”, em superfícies submersas é reconhecida universalmente (EVANS *et al.*, 2000a).

Desde a antiguidade, o homem já procurava modos de impedir a bioincrustação nos cascos de suas embarcações. Povos reconhecidos como grandes navegadores da antiguidade, tais como fenícios e cartagineses, utilizavam

peças de cobre e piche com esse objetivo. Gregos e romanos se utilizavam de peças de chumbo em seus cascos, pregos de cobre para sua fixação e coberturas de betume. Povos mais antigos empregavam certas substâncias e materiais como ceras, alcatrões, asfaltos, zinco, porcelana, cimento romano, couro, estanho, borracha da Índia, vidro, latão, papel de linho entre outros para o mesmo fim. (YEBRA *et al.*, 2004; YOUNG, 1867).

Patentes de anti-incrustantes que utilizavam cobre em suas formulações surgiram no século XVII, porém a partir do século XVIII as propriedades do cobre foram reconhecidas e o material passou a substituir definitivamente o chumbo. Cobrir uma embarcação com cobre representava um custo semelhante a cobri-la com madeira, e em relação à proteção contra o molusco *Teredo* foi considerada uma estratégia bastante eficaz (YOUNG, 1867).

Quando os cascos de ferro tornaram-se necessários, principalmente em virtude da crescente utilização do motor a vapor, da escassez de madeira existente na época, além da cara manutenção que estes cascos exigiam, as primeiras tintas anti-incrustantes foram criadas e em pouco tempo havia mais de 300 delas. Inúmeras substâncias como compostos de mercúrio, arsênico e o DDT foram utilizadas até o início de 1960. Nessa época as tintas contendo óxido de cobre eram as mais utilizadas (LUDGATE, 1987), quando, por apresentarem severos riscos ambientais e de saúde pública, além de apresentarem uma efetividade inferior a 1 ano, começaram a ser substituídas por compostos organoestânicos, tendo como protagonista um composto chamado Tributilestanho (TBT) (ALMEIDA *et al.*, 2007)

O TBT foi um biocida muito mais eficiente contra os organismos bioincrustantes que seus antecessores, mas apresentava uma taxa de liberação no ambiente ainda muito alta e rápida. Logo após a aplicação, em cerca de 1 ano deixava de possuir ação anti-incrustante satisfatória. Esse problema foi sanado na década de 1970 com a combinação do TBT ao polímero metacrilato, que permitia uma liberação do produto no ambiente muito mais estável e duradoura. Esta combinação garantia uma boa ação biocida e espaçava a docagem das embarcações para re-aplicação da tinta em cinco anos ou mais (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Apesar destas vantagens, a toxicidade do TBT a organismos não alvo é elevada e sua persistência ambiental longa (GARAVENTA *et al.*, 2007; LEUNG *et al.*, 2004). Ao ser liberado na coluna d'água o TBT apresenta meia vida curta, de

alguns dias ou no máximo uma ou duas semanas, mas nos sedimentos, sua persistência pode ser elevada em meses ou até mesmo em anos (CLARK *et al.*, 1988) Outro problema observado com o TBT foi sua toxicidade potencial à vida marinha, mesmo em concentrações muito baixas (ALZIEU, 2000). Como exemplo pode-se citar o “imposex”, efeito crônico observado em moluscos que resulta na masculinização das fêmeas, podendo gerar a infertilidade desses organismos (LEUNG *et al.*, 2004). Embora esses problemas tenham sido observados, as tintas a base de TBT se tornaram extremamente populares, chegando a revestir os cascos de 100% dos navios produzidos nos estaleiros japoneses durante a década de 1980 (LUDGATE, 1987; SCHATZBERG, 1987). Nessa época as concentrações de TBT na coluna d’água, em regiões de alto fluxo de embarcações, alcançava níveis alarmantes (EVANS *et al.*, 2000b)

2.2. A atualidade

No início da década de 1980 o uso de tintas a base TBT começou a ser proibido em vários países, sobretudo em embarcações pequenas (menores que 25 metros de comprimento) e concentrações limites foram sendo impostas aos poucos em territórios de vários países, como na França em 1982 e na Inglaterra em 1987 (CHAMP, 2000; DE MORA e PELLETIER, 1997). No Brasil, em março de 2005, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), através da resolução 357 de 17 de março do ano de 2005, determinou limites de concentrações máximas de TBT permitidas para as diversas classes de águas brasileiras (CONAMA, 2005).

A última iniciativa importante ao banimento mundial do uso do TBT como anti-incrustante ocorreu em 17 de setembro de 2008, quando inúmeros países ratificaram a Convenção sobre o Sistema Anti-incrustante da Organização Marítima Internacional (*Anti-fouling System, AFS, Convention - International Maritime Organization, IMO*). Esses países se comprometeram a banir a aplicação de TBT em todos os seus navios, assim como tornar a entrada de embarcações que contenham TBT em seus cascos proibida em seus portos (IMO 2008) .

Devido às restrições e ao banimento mundial das tintas anti-incrustantes a base de TBT, a indústria naval precisou rapidamente fazer uso de uma nova geração de tintas. Foram desenvolvidas então tintas anti-incrustantes contendo

diversos tipos de biocidas, tais como o Diuron, Irgarol 1051, Sea-nine 211, zinco-piritiona, Zineb, entre outros (KONSTANTINOOU e ALBANIS, 2004). Tais substâncias biocidas são utilizados em tintas conjuntamente ao cobre. Em todo mundo, cerca de 18 desses compostos estão sendo utilizados como anti-incrustantes (THOMAS *et al.*, 2000). Como essas novas substâncias biocidas também são tóxicas, a avaliação dos seus níveis e efeitos no ambiente aquático tem sido um tópico de crescente importância nos últimos anos (KONSTANTINOOU e ALBANIS, 2004).

Assim sendo, em 1998 o Reino Unido adotou restrições a alguns dos novos biocidas, proibindo a utilização de tintas que possuíssem os compostos diclofluanido, zinco-piritiona ou zineb para embarcações com menos de 25 metros de comprimento, enquanto que tintas que contivessem Irgarol 1051, clorotalonil e Sea-nine 211 como biocida poderiam ser utilizados em embarcações de qualquer tamanho (THOMAS *et al.*, 2001). Restrições aos novos biocidas também foram impostas na Dinamarca e Suécia, onde o Irgarol 1051 e o Diuron só podem ser utilizados em embarcações maiores de 25 metros de comprimento (THOMAS, 2001).

2.3. Compostos Seleccionados para Estudo

2.3.1. Irgarol 1051

O Irgarol 1051 (2 metiltio-4-*tert*-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) é um biocida pertencente ao grupo químico das triazinas (Figura 1), utilizado exclusivamente associado a tintas anti-incrustantes. Ele vem sendo utilizado desde a década de 80 na Europa, porém apenas em 1998 foi registrado para uso nos EUA. Há poucos anos atrás era o biocida anti-incrustante mais frequentemente detectado em ambientes aquáticos (KONSTANTINOOU e ALBANIS, 2004) embora atualmente seu uso esteja diminuindo devido as constantes restrições impostas quanto a sua aplicação ao redor do globo (THOMAS, 2001).

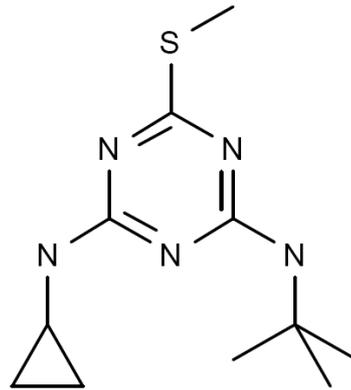


Figura 1 – Fórmula estrutural do Irgarol 1051.

Fonte: Ciba Specialty Chemicals Inc. 2004.

O Irgarol 1051 é um potente inibidor do fotossistema II e é altamente tóxico para plantas aquáticas. Para a maioria das classes de animais sua toxicidade é considerada baixa (MORELAND, 1980). Por isso, esse composto invariavelmente é combinado com cobre para promover uma ação anti-incrustante eficiente também contra animais. O Irgarol é o componente mais hidrofóbico da família das triazinas por apresentar tanto o grupo *tert-butil* quanto o grupo *ciclopropil*. Apesar disso, segundo Thomas (2001) e Tolosa *et al.* (1996), ele é encontrado quase que predominantemente em coluna d'água, sendo raramente depositado no sedimento. Isto ocorre porque o composto apresenta uma afinidade muito baixa pelo último.

O Irgarol 1051 é extremamente estável no ambiente marinho (OKAMURA *et al.*, 2000), possuindo uma degradação lenta, sendo portanto considerado cumulativo no ambiente. Três metabólitos resultantes de sua degradação foram identificados até o momento, sendo designados como M1, M2 e M3 (LAM *et al.*, 2005). O metabólito M1 (2-metiltio-4-*tert*-butylamino-6-amino-s-triazina) apresenta maior toxicidade que o Irgarol 1051 para plantas terrestres que vivem próximas a corpos d'água. Em contrapartida, seu precursor apresenta maior toxicidade para o fitoplâncton e macrófitas aquáticas (DAHL e BLANCK, 1996; ZHANG *et al.*, 2008). Pesquisas indicam que a estabilidade de M1 no ambiente possa ser ainda maior do que do Irgarol 1051 (LAM *et al.*, 2005). Apesar do exposto, os três metabólitos carecem de estudos quanto a sua toxicidade, pois pouco se conhece quanto a seu comportamento no ambiente. O Irgarol 1051 pode ser degradado sob ação do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, no entanto é muito estável à biodegradação, assim

como à hidrólise e calor. Mesmo sua degradação pela luz solar é lenta, mas quando ocorre associada a substâncias orgânicas, principalmente substâncias húmicas, ela ocorre rapidamente (OKAMURA *et al.*, 2003). Apesar disso a legislação brasileira não prevê o controle dos níveis ambientais do Irgarol 1051.

2.3.2. Diuron

O Diuron [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia] é um herbicida pertencente ao grupo químico das feniluréias (Figura 2). Ele atua inibindo a fotossíntese pelo bloqueio da produção de oxigênio (WESSELS e VAN DER VEEN, 1956), resultando finalmente em uma interrupção na transferência de elétrons ao nível do fotossistema II. Esse biocida parece apresentar uma pequena toxicidade para mamíferos, sendo principalmente teratogênico em altas dosagens em ratos. A sua toxicidade para aves e a maioria dos invertebrados é pequena, embora certos organismos como os crustáceos pareçam ser afetados por concentrações muito baixas. Para os peixes, sua toxicidade é considerada moderada (GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

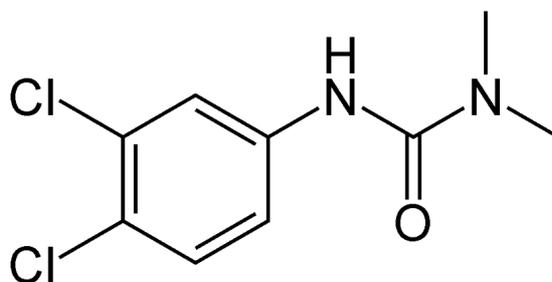


Figura 2 – Fórmula estrutural do Diuron

Fonte: Velandur, 2006.

O Diuron foi muito usado em lavouras para o controle de pragas, atingindo freqüentemente corpos d'água adjacentes por lixiviação (WAUCHOPE, 1978). Este composto tem alta persistência (um mês a um ano), podendo ser encontrado em sedimento ou coluna d'água (OKAMURA *et al.*, 2003). Sua degradação pode ocorrer

por irradiação solar em corpo d'água, mas a principal forma de degradação do Diuron parece ser a biodegradação por uma série de microorganismos, resultando nos metabólitos 3,4-dicloroanilina, 3,4-diclorometilfenilurea e 3,4-diclorofenilurea (GEISSBUHLER *et al.*, 1975; ROQUE 2000; TIXIER *et al.*, 2000, 2001, 2002; GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

O Diuron é considerado uma “Substância Perigosa Prioritária” pela Comissão Européia (MALATO *et al.*, 2002). No Brasil não existe legislação pertinente ao uso de Diuron como agente anti-incrustante.

2.4. Organismo- teste

A *Acartia tonsa* (Dana, 1849) é um copépodo (Subfilo Crustacea, classe Copepoda) pertencente à ordem Calanoida. Copépodos calanóides são uma peça chave na ciclagem de nutrientes e energia nos ecossistemas marinhos, pois formam uma ligação trófica dinâmica entre a produção primária (fitoplâncton) e terciária (principalmente peixes planctívoros) (DEYOUNG *et al.*, 2004). A *Acartia tonsa* durante estações quentes é seguidamente o organismo zooplanctônico dominante nas regiões onde é encontrado, seja em número ou biomassa (MAUCHLINE *et al.*, 1998). A espécie *A. tonsa* tem uma distribuição ampla, sendo observada desde a costa do Canadá até a Argentina, no Oceano Atlântico, além de sua ocorrência também ter sido reportada no norte no Oceano Pacífico (SABATINI, 1990). Há cerca de uma década a espécie foi enquadrada como cosmopolita (RAZOULS & BOUVÉE, 1998).

Em estações frias sua ocorrência diminui drasticamente. Neste caso, ao perceber uma baixa mais severa na temperatura, as fêmeas param de produzir os ovos comuns de postura e eclosão instantâneas e passam a produzir ovos resistentes, em diapausa, que eclodem apenas quando a temperatura atinge o limiar acima de 10°C (HOLSTE e PECK, 2006), permitindo um repovoamento rápido e eficiente do ambiente.

Espécimes presentes no báltico foram testados quanto à postura de ovos e eclosão dos mesmos sob várias temperaturas e salinidades e demonstraram um gradiente largo de sucesso reprodutivo em grandes variações desses fatores (HOLSTE e PECK, 2006).

Devido a essas características, *A. tonsa* é facilmente cultivada em laboratório (STØTTRUP *et al.*, 1997; STØTTRUP 2000), além de ser uma das espécies de copépodo mais estudadas no mundo todo (MAUCHLINE *et al.*, 1998). Embora essas características mostrem que o animal é adaptável as mais diversas condições ambientais, foi demonstrado que a espécie é sensível a uma grande variedade de substâncias tóxicas (BRADLEY, 1977; ROBERTS e GLEESON, 1978; SOSNOWSKI e GENTILE, 1978; HORNE *et al.*, 1983; SULLIVAN E RITACCO, 1985; WARD e BALLANTINE, 1985; ANDERSEN *et al.*, 1999; MEDINA e BARATA, 2004), o que a torna importante para ensaios toxicológicos. *A. tonsa* é uma espécie padronizada nos protocolos de ensaios de toxicidade e, portanto uma espécie apropriada para as análises nesta área de estudo (ISO 1999; MEDINA e BARATA, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios toxicológicos, bem como o cultivo dos organismos utilizados, foram realizados no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática - CONECO, situado no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

A água marinha utilizada nos cultivos e nos ensaios foi obtida da Estação Marinha de Aqüicultura (FURG), coletada diretamente do ambiente. Em laboratório, a água foi filtrada em cartuchos de 1 µm de porosidade.

3.1. Cultivo de *Acartia tonsa*

O cultivo foi mantido sob aeração constante em sala climatizada e em condições controladas de temperatura (20°C) e fotoperíodo (12C:12E). Os organismos foram mantidos em água marinha filtrada com salinidade 30, com o fornecimento diário de uma dieta mista das microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana* (KAMINSKI, 2004). Para a manutenção da qualidade do cultivo, renovações totais de água foram realizadas semanalmente.

3.2. Cultivo de *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana*

A manutenção de *A. tonsa* em cultivo exigiu o cultivo paralelo das microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana*. Os cultivos algais foram iniciados para fornecer suporte na provisão diária de alimento ao cultivo de *A. tonsa*. As culturas de *I. galbana* e *T. weissflogii* foram mantidas em erlenmeyers de 100 mL, sendo semanalmente re-inoculadas em galões de 3 L com água do mar filtrada (1 µm) em meio de cultivo F/2 (GUILLARD, 1975).

3.3. Preparo das Soluções de Exposição

As soluções-estoque (4 mg L⁻¹) foram previamente preparadas através da dissolução dos padrões de Irgarol 1051 (pureza > 98%) e o Diuron (pureza 99,5%) de grau analítico obtidos da *Sigma-Aldrich* em acetona, uma vez que esses compostos são pouco solúveis em água. A escolha deste solvente foi baseada nos resultados obtidos em testes preliminares, os quais estão apresentados e discutidos nos Resultados.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções-estoque em água do mar natural filtrada (porosidade 0.3 µm). Essas soluções tiveram a salinidade ajustada para 30 utilizando sal artificial com características idênticas e condições gerais dos cultivos, porém sem aeração.

3.4. Lavagem do material utilizado

Toda a vidraria utilizada foi primeiramente imersa em solução de detergente neutro (10% v/v) por 12h, depois foi enxaguada com água da torneira por cinco vezes, rinsada com álcool etílico 95%, enxaguada com água da torneira por mais cinco vezes e rinsada com acetona. Após ser enxaguada mais cinco vezes com água da torneira, a vidraria é então imersa em ácido (HNO₃ 10% v/v) por 12 horas. Ao final esse material é enxaguado com água da torneira cinco vezes, e borrifado com água destilada. O material plástico não passou pelos processos em que se utilizou acetona ou ácido. Em vez disso, foi imerso em detergente neutro (10% v/v)

por 12h, enxaguado com água da torneira por cinco vezes, rinsado com álcool etílico 95%, enxaguado novamente por mais cinco vezes e, finalmente, lavado com água destilada.

3.5. Ensaio de Toxicidade Aguda

Os ensaios de toxicidade aguda com o copépodo *A. tonsa* foram realizados baseados na metodologia descrita em *International Standardization Organization* (ISO 1999) . Foi realizado um ensaio em separado para Irgarol 1051 e outro para Diuron. Os organismos foram expostos a diferentes concentrações das substâncias-teste e o efeito tóxico determinado de acordo com a mortalidade dos organismos ao final de 48 horas de exposição.

Foram utilizados copépodos adultos, sem distinção de sexo. Durante a montagem dos ensaios, foi utilizada uma caixa de iluminação inversa para facilitar a visualização dos organismos. Com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, os copépodos obtidos do cultivo foram colocados em recipientes de vidro contendo 50 mL de solução-teste nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para de Irgarol 1051 ou Diuron. Os ensaios foram feitos em quadruplicata contendo geralmente 10 organismos por réplica, sob condições idênticas as do cultivo. Houveram alguns erros na manipulação de algumas amostras, o que resultou em menos de 10 organismos em certos frascos. O programa utilizado nos cálculos de CL_{50} , Spearman-Kärber, corrigiu esse problema.

Os ensaios com as substâncias de referência foram realizados utilizando as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L^{-1} de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). Como água de diluição e controle, foi utilizada água marinha filtrada com salinidade 30. Os ensaios foram realizados em quadruplicata contendo de 10 organismos por réplica, sob as mesmas condições de cultivo.

Foram conduzidos testes preliminares para avaliar a toxicidade de dois solventes (acetona e etanol) em baixas concentrações, baseados na concentração total que teriam nas soluções-teste dos compostos anti-incrustantes. Para acetona, as concentrações utilizadas foram: 0,5 mL L^{-1} ; 0,25 mL L^{-1} ; 0,125 mL L^{-1} ; 0,06 mL L^{-1} e 0,03 mL L^{-1} ; e para o etanol as concentrações foram de 1,2 mL L^{-1} ; 0,6 mL L^{-1} ; 0,3

mL L⁻¹; 0,15 mL L⁻¹ e 0,07 mL L⁻¹. Os ensaios foram realizados em duplicatas contendo 10 organismos por réplica, sob as mesmas condições de cultivo.

A mortalidade dos copépodos foi quantificada ao final de 48 horas e indicada pela ausência de movimento, mesmo após estímulo físico, sendo confirmada através de observações em lupa. A toxicidade das substâncias-teste foi expressa pela CL₅₀ 48h, referente à concentração letal para 50% dos organismos expostos ao final de 48 horas. Os valores de CL₅₀ e os limites de 95% de confiança foram calculados através do programa estatístico *Trimmed Spearman-Kärber*. Como critério de aceitabilidade foi considerado apenas os ensaios em que a mortalidade no Controle foi igual ou inferior a 10% (ISO, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio com substância de referência

Os percentuais de sobrevivência do ensaio ecotoxicológico com *Acartia tonsa* exposta à substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio está apresentado na Tabela 1. O valor da CL₅₀ encontrado foi de 1,44 mg L⁻¹ com intervalos de confiança superior e inferior de 1,25 e 1,65 mg L⁻¹, respectivamente (IHARA, 2008).

Tabela 1 – Taxa de sobrevivência (%) de *Acartia tonsa* após 48 h de exposição à Dodecil Sulfato de Sódio (DSS).

Concentração (mg L ⁻¹)	Réplica	Réplica	Réplica	Réplica	Média
	A	B	C	D	
Controle	90	80	89	100	90
0,5	60	88	80	89	79
1,0	70	80	63	78	73
1,5	25	50	40	75	48
2,0	30	10	10	20	18
2,5	0	0	10	0	3

4.2. Ensaio com solventes

A acetona não apresentou toxicidade para *Acartia tonsa*, uma vez que não houve mortalidade significativa para nenhuma das concentrações estudadas (Tabela 2). Já para etanol, a mortalidade foi total em todas as concentrações testadas (Tabela 3).

Tabela 2: Taxa de sobrevivência (%) de *Acartia tonsa* em acetona, após 48 horas de exposição.

Concentração (%)	Réplica A	Réplica B
0,5	90	90
0,25	80	90
0,125	70	60
0,06	100	80
0,03	90	90
Controle	100	100

Tabela 3: Taxa de sobrevivência (%) de *Acartia tonsa* em etanol, após 48 horas de exposição.

Concentração (%)	Réplica A	Réplica B
2,0	0	0
1,5	0	0
1,0	0	0
0,5	0	0
0,25	0	0
Controle	100	100

4.3. Ensaio Toxicológico com Irgarol 1051

Ao final de 48 horas, os percentuais de sobrevivência média para cada concentração foram de 86% para 1 $\mu\text{g L}^{-1}$; 48% para 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; 36 % para 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; e 14% para a concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 4). A CL_{50} foi de 28,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os limites de 95% de confiança variaram entre 14, 35 e 55,15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 4 – Taxa de sobrevivência (%) de *Acartia tonsa* após 48 h de exposição à Irgarol 1051.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Réplica D	Réplica E	Média
Controle	63	100	100	100	88	90
1	80	100	90	90	70	86
10	80	50	30	30	50	48
100	30	10	20	20	100	36
1000	20	10	10	20	10	14

4.4. Ensaio Toxicológico com Diuron

Para o Diuron, a mortalidade média nas concentrações de 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi de 13%, 27%, 34% e 32%, respectivamente (Tabela 5). A CL_{50} e os limites de 95% de confiança foram de 16,95 e 3,70 – 77,75 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 5 - Taxa de sobrevivência (%) de *Acartia tonsa* após 48 h de exposição à Diuron.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Réplica D	Réplica E	Média
Controle	63	100	100	100	88	90
1	70	80	80	80	60	74
10	50	50	40	40	50	46
100	30	30	40	30	40	34
1000	20	40	30	20	50	32

5. DISCUSSÃO

O solvente escolhido para todos os ensaios foi a acetona, pois seu grau de toxicidade a *Acartia tonsa* pode ser considerado nulo.

Os ensaios ecotoxicológicos apresentam variabilidades relacionadas a fatores que podem ser atribuídos desde a habilidade de execução técnica até a variabilidade intrínseca da sensibilidade do organismo-teste utilizado. Desta forma, uma avaliação da sensibilidade do organismo-teste frente a uma substância de referência (Controle Positivo) é necessária (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Devido à ausência de uma carta-controle para *Acartia tonsa* no laboratório e por tratar-se de um cultivo implantado recentemente, a sensibilidade do lote de organismos-teste utilizado nos experimentos foi avaliada utilizando dados reportados na literatura. Dados esses que analisassem a mesma espécie e substância de referência utilizadas no presente estudo (Tabela 6).

Os resultados obtidos para substância de referência, bem como os resultados apresentados por IHARA (2008), a qual trabalhou com organismos oriundos do mesmo cultivo, encontram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido pela

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) (EPA 2002) . Isso indica que os organismos usados, bem como os dados gerados, estavam dentro dos padrões internacionais de confiabilidade.

Tabela 6 - Valores de CL₅₀ 48h ($\mu\text{g L}^{-1}$) de *Acartia tonsa* exposta a Dodecil Sulfato de Sódio (DSS).

Espécie	CL ₅₀	Referência
<i>Acartia tonsa</i>	1440	Presente estudo
	1270	IHARA, 2008
	1890	ROSSATO, 2008

No presente estudo o Irgarol 1051 (CL₅₀ 28,13 $\mu\text{g L}^{-1}$), se mostrou menos tóxico que o Diuron (CL₅₀ 17,18 $\mu\text{g L}^{-1}$), embora para ambos os compostos a CL₅₀ tenham se apresentado na mesma ordem de magnitude e dentro do intervalo de confiança. A toxicidade de Diuron apresentou um aumento pouco expressivo junto à elevação das concentrações no ensaio, enquanto Irgarol 1051 teve sua toxicidade elevada de forma mais significativa com o aumento das concentrações. Irgarol 1051 é um composto que apresenta uma baixa toxicidade em animais, mas por ser um herbicida, sua toxicidade para fitoplâncton e macroalgas é alta (KOBAYASHI e OKAMURA, 2002; KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004). Diuron também é mais tóxico a plantas do que a animais, pois além de também ser um herbicida, ele apresenta um meio de ação semelhante à Irgarol 1051 em plantas (WALSH e GROW, 1971; BROWN e LEAN, 1995, KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004). Sobre crustáceos (Tabela 7), Diuron parece ser um pouco mais tóxico que Irgarol 1051. Para *Americamysis bahia* a CL₅₀ observada para Irgarol 1051 foi de 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto para Diuron foi 1100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS, 2000). Do mesmo modo, *Nitocra spinipes* apresenta CL₅₀ quando exposta a Irgarol de 4500 $\mu\text{g L}^{-1}$ contra 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Diuron (KARLSSON *et al.*, 2006). Trabalhos que realizaram testes de toxicidade crônica de alguns compostos anti-incrustantes sobre células de peixe e ovos e embriões de ouriços do mar apresentaram o seguinte gradiente de toxicidade: zinco piritiona > Sea-nine 211 > Diuron > Irgarol 1051 (KOBAYASHI e OKAMURA, 2002; OKAMURA, 2002; KONSTANTINOU e

ALBANIS, 2004) Esses resultados corroboram também para essa mesma linha de discussão.

Em comparação com algumas espécies de água doce (Tabela 7), primeiramente ambos os compostos apresentam-se dentro da mesma faixa de concentração sobre *Daphnia magna*, com uma diferença estatisticamente irrelevante (OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS, 2000; OKAMURA *et al.*, 2000). Em relação a espécies de peixe, para *Oncorhynchus mykiss* a CL₅₀ de Diuron é de 74000 µg L⁻¹ e de Irgarol 25000 µg L⁻¹ (OKAMURA *et al.*, 2002). Nesse caso Irgarol 1051 demonstrou-se muito mais tóxico do que Diuron, chegando a possuir CL₅₀ três vezes menor. Do mesmo modo, para *Lepomis macrochirus* a CL₅₀ de Diuron é de 9300 µg µg L⁻¹ (OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS, 2000), enquanto que a de Irgarol fica na casa dos 2600 µg L⁻¹ (MAYER E ELLERSIECK, 1986). É importante ressaltar que *Daphnia magna*, *Oncorhynchus mykiss* e *Lepomis macrochirus* são organismos de água doce e que os mecanismos de toxicidade de diversos compostos variam em função da salinidade.

Tabela 7 – LC₅₀ (µg L⁻¹) de Diuron e Irgarol 1051 sobre espécies de organismos marinhos.

Classe	Organismo teste	Tempo de exposição	Irgarol	Diuron	Referência
Crustacea	<i>Acartia tonsa</i>	48h	28	17	Presente trabalho
	<i>Americamysis bahia</i>	96h	1500	1100	OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS (2000)
	<i>Daphnia magna</i>	48h	8300 ¹	8400 ²	OKAMURA <i>et al.</i> (2000) ¹ ; OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS (2000) ²
	<i>Nitocra spinipes</i>	96h	4500	4000	KARLSSON <i>et al.</i> (2006)
Actinopterygii	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	168h	25000	74000	OKAMURA <i>et al.</i> (2002)
	<i>Lepomis macrochirus</i>	96h	2600 ³	9300 ⁴	OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS (2000) ³ ; MAYER e ELLERSIECK (1986) ⁴

Acartia tonsa mostrou-se muito sensível ao Irgarol 1051 e Diuron. *Mysidopsis bahia*, exposto a Irgarol 1051, apresentou CL₅₀ (96h) de 400 µg L⁻¹ (HALL *et al.*,

1999), bem mais tolerante do que *A. tonsa*. *Gammarus lacustris*, exposto a Diuron, teve sua CL₅₀ registrada como 380 µg L⁻¹ (SANDERS, 1969), portanto uma espécie sensível ao composto, embora também bem mais tolerante do que *A. tonsa*.

A. tonsa é uma espécie sensível a tóxicos de uma forma geral. Para um composto chamado “KETHON CG 243”, a CL₅₀ é 56 µg L⁻¹ (OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS, 2000). Para outro composto, denominado citrato de tamoxifeno, a CL₅₀ fica por volta de 49 µg L⁻¹ (ANDERSEN *et al.*, 2001) Mesmo os compostos sendo considerados extremamente tóxicos a espécie, Irgarol e Diuron ainda apresentam a concentração letal mais baixa.

Finalmente, os valores de CL₅₀ de Irgarol 1051 observados para *A. tonsa* estão acima da faixa de concentrações encontradas em meio ambiente. Concentrações de Irgarol 1051 em coluna d'água em áreas de marinas e portos podem variar de não detectável, 1,5 µg L⁻¹ ou chegar a altos níveis como 4,2 µg L⁻¹ em áreas de marinas (HERNANDO *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2001; BASHEER *et al.*, 2002; KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004). Essas são regiões que apresentam alto fluxo de embarcações, sendo, portanto, passíveis de serem encontradas altas concentrações de compostos anti-incrustantes em coluna d'água e sedimento. Em ambiente marinho e estuarino, distante dessas áreas críticas, as concentrações de Irgarol 1051 são consideravelmente menores (GOUGH *et al.*, 1994; ZHOU *et al.*, 1996; KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004) Os valores encontrados para Diuron indicam que existe a possibilidade de regiões com alta contaminação do composto causarem efeitos tóxicos agudos na espécie. Apesar de Diuron apresentar altas concentrações (2 - 3 µg L⁻¹) em marinas, portos e outras regiões de movimentação naval, níveis elevados da substância (1 - 6,7 µg L⁻¹) também podem ser encontrados em estuários, até mesmo ultrapassando os valores observados em marinas (MARTINEZ *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2001; OKAMURA *et al.* 2003; KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004). É importante ressaltar que os valores detectados de Diuron podem ser resultado não apenas do uso como agente anti-incrustante, mas também como herbicida no controle de ervas daninhas, chegando aos corpos d'água através da lixiviação (WAUCHOPE, 1978; GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

A. tonsa apresentou valores de CL₅₀ que indicam que ela pode sofrer efeitos agudos de Diuron, mas não de Irgarol 1051 no ambiente. Contudo, é possível que a espécie possa ser afetada por toxicidade crônica aos compostos. Futuros estudos

de toxicidade crônica sobre a espécie, assim como ensaios toxicológicos com outros organismos existentes em território nacional (nativos ou não) são fundamentais para a geração de um quadro ecológico mais sólido, que permita uma legislação sóbria, com dados realistas e condizentes com a realidade de nosso meio ambiente.

6. CONCLUSÃO:

Acartia tonsa demonstrou ser muito sensível aos dois compostos se comparada com outros crustáceos marinhos. Concentrações ambientais de Diuron podem causar efeitos tóxicos agudos na espécie, embora para Irgarol 1051 não tenha sido encontrada concentração no ambiente capaz de atingir valores capazes do mesmo. Repetições dos testes são fundamentais para confirmação desta hipótese. Ensaio crônicos se fazem necessários para a montagem de um quadro mais completo da toxicidade de Irgarol 1051 e Diuron sobre *Acartia tonsa*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALMEIDA E.; DIAMANTINO T. C., e DE SOUSA O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, 59: 2-20, 2007.

ALZIEU C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, 258: 99-102, 2000.

ANDERSEN H. R.; HALLING-SORENSEN B., e KUSK K. O. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 44: 56-61, 1999.

ANDERSEN, H.R., L. WOLLENBERGER, B. HALLING-SORENSEN, AND K.O. KUSK. Development of Copepod Nauplii to Copepodites - a Parameter for Chronic Toxicity Including Endocrine Disruption. **Environ.Toxicol.Chem.** 20(12):2821-2829, 2001.

BASHEER C.; TAN K. S., e LEE H. K. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, 44: 697-703, 2002.

BRADLEY, B.P. Comparison of Residual Biototoxicity of Chlorine and Bromine Chloride to Copepods. **Tech.Rep.**, 47, Water Resour.Res.Center, Maryland Univ., College Park, Md, 1977.

BROWN, L.S., AND D.R.S. LEAN. Toxicity of selected pesticides to lake phytoplankton measured using photosynthetic inhibition compared to maximal uptake rates of phosphate and ammonium. **Environ.toxicol.chem.** 14(1):93-98, 1995.

CASTRO I. B.; RODRIGUES-QUEIROZ L., e ROCHA-BARREIRA C. A. Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha - uma Revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, in press: 2006.

CHAMP M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment**, 258: 21-71, 2000.

CLARK E. L.; STERRIT R. M., e LESTER J. N. The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment a Look at the Data. **Environmental Science and Technology**, 22: 600-604, 1988.

CONAMA. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, 53: 58-63, 2005.

DAHL B. e BLANCK H. Use of sand-living microalgal communities (epipsammon) in ecotoxicological testing. **Marine Ecology-Progress Series**, 144: 163-173, 1996.

DE MORA S. J. e PELLETIER E. Environmental tributyltin research: Past, present, future. **Environmental Technology**, 18: 1169-1177, 1997.

DESIMONE J. M. e ROLLAND J. Synthesis and characterization of perfluoropolyether graft terpolymers for biofouling applications. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, 225: 350-PMSE, 2003.

DEYOUNG B.; HEATH M.; WERNER F.; CHAI F.; MEGREY B., e MONFRAY P. Challenges of Modeling ocean basin ecosystems. **Science**, 304: 1463-1466, 2004.

EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environmental Protection Agency. -275, 2002.

EVANS S. M.; BIRCHENOUGH A. C., e BRANCATO M. S. The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire? **Marine Pollution Bulletin**, 40: 204-211, 2000a.

EVANS S. M.; BIRCHENOUGH A. C., e FLETCHER H. The Value and Validity of Community-based Research: TBT Contamination of the North Sea. **Marine Pollution Bulletin**, 40: 220-225, 2000b.

GARAVENTA F.; CENTANNI E.; PELLIZZATO F.; FAIMALI M.; TERLIZZI A., e PAVONI B. Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian Coast (Croatia). **Marine Pollution Bulletin**, In Press, Corrected Proof: 2007.

GEISSBUHLER, H.; MARTIN, H.; VOSS, G. Phenylureas. In: KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. (Ed.). *Herbicides: chemistry, degradation and mode of action*. 2nd ed. **New York: Marcel Dekker**. v. 1, p. 216-218, 1975.

GIACOMAZZI S. e COCHET N. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, 56: 1021-1032, 2004.

GOUGH MA, FOTHERGILL J, HENDRIE JD. A survey of Southern England coastal waters for the s-Triazine antifouling compound Irgarol 1051. **Mar Pollut Bull**;28:613–20, 1994.

GUILLARD R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. in "Culture of Marine Invertebrate Animals." (eds: Smith W.L. and Chanley M.H.) **Plenum Press**, New York, USA. pp 26-60, 1975.

HALL, L.W.J., GIDDINGS, J.M., SOLOMON, K.R., BALCOMB, R. An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. **Crit. Rev. Toxicol.** 29, 367} 437, 1999.

HERNANDO M. D., PIEDRA L., BELMONTE A., AGÜERA A., FERNÁNDEZ-ALBA A. R. Determination of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionization and tandem mass spectrometric detection. **J. Chromatogr.** 938:103-11, 2001.

HOLSTE L. e PECK m. A. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda : Calanoida): a laboratory investigation. **Marine Biology**, 148: 1061-1070, 2006.

HORNE, J.D., M.A. SWIRSKY, T.A. HOLLISTER, B.R. OBLAD, AND J.H. KENNEDY. 5 Aquatic toxicity studies of five priority pollutants. rep.no.4398, final report, EPA contract no.68-01-6201, **nus corp.**, houston, tx :196 p., 1983.

IHARA P. M. **Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida**. 2008. 86f Tese (Mestrado em Oceanografia Química) – Faculdade de Oceanologia, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande.

IMO. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. 2008.

ISO. Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). **International Organization for Standardization**. 1999.

KAMINSKI, S. M.; BERSANO, J. G. F.; CARDOZO, A. P.; AMARAL, W. J. A. Curvas de Saturação Alimentar para o Copépode *Acartia tonsa* sob diferentes Concentrações de *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira fluviatillis*. In: XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar (COLACMAR), 2007, Florianópolis. **Anais do XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar** - Livro de Resumos e CD-ROM, 2007. p. 128-129

KARLSSON J.; BREITHOLTZ M., e EKLUND B. A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. **Marine Pollution Bulletin**, 52: 1661-1667, 2006.

KOBAYASHI N. e OKAMURA H. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. **Marine Pollution Bulletin**, 44: 748-751, 2002.

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

LAM K.; CAI Z.; WAI H.; TSANG V.; LAM M.; CHEUNG R.; YU H., e LAM P. Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in costal waters. **Environmental Pollution**, 136: 230, 2005.

LEUNG K. M. Y.; MORLEY N. J.; GRIST E. P. M.; MORRITT D., e CRANE M. Chronic toxicity of tributyltin on development and reproduction of the hermaphroditic snail *Physa fontinalis*: Influence of population density. **Marine Environmental Research**, 58: 157-162, 2004.

LIU L. L.; CHEN S. J.; PENG W. Y., e HUNG J. J. Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. **Environmental Pollution**, 98: 113-118, 1997.

LUDGATE J. Economic and Technological Impact of TBT Legislation on the USA Marine Industry. **Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference.**, 4: 1309-1313, 1987.

MALATO S.; BLANCO J.; CACERES J.; FERNANDEZ-ALBA A. R.; AGUERA A., e RODRIGUEZ A. Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO₂ using solar energy. **Catalysis Today**, 76: 209-220, 2002.

MAUCLINE J, BLAXTER JHS, SOUTHWARD AJ, and TYLER PA. Advances in marine biology - The biology of calanoid copepods - Introduction. **Advances in Marine Biology.**, 1998.

MAYER, F.L. JR., E M.R. ELLERSIECK. **Manual of acute toxicity:** interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Resour.publ.no.160, u.s.dep.interior, fish wildl.serv., washington, dc :505 p. (usgs data file), 1986.

MEDINA M. e BARATA C. Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) for ecotoxicological testing. **Aquaculture**, 229: 203-213, 2004.

MORELAND D. E. Mechanisms of Action of Herbicides. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 31: 597-638, 1980.

OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS. Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). **Environmental Fate and Effects Division**, U.S.EPA, Washington, D.C., 2000.

OKAMURA H. Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron released from a commercial antifouling paint. **Chemosphere**, 48: 43-50, 2002.

OKAMURA H.; AOYAMA I.; LIU D.; MAGUIRE R. J.; PACEPAVICIUS G. J., e LAU Y. L. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. **Water Research**, 34: 3523-3530, 2000.

OKAMURA H.; WATANABE T.; AOYAMA I.; HASOBE M. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. **Chemosphere** Volume 46, Issue 7, February, Pages 945-951, 2002.

OKAMURA H.; AOYAMA i.; ONO Y., e NISHIDA T. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. **Marine Pollution Bulletin**, 47: 59-67, 2003.

RAZOULS, C. & F. DE BOUVÉE. Diversity and geographical distribution of pelagic Copepoda. An overview and initial interpretation. **Annales de l'Institut Oceanographique** 74: 139–200, 1998.

ROBERTS, M.H.JR., E GLEESON R.A. Acute toxicity of bromochlorinated seawater to selected estuarine species with a comparison to chlorinated seawater toxicity. **Mar.Environ.Res.** 1(1):19-30, 1978.

ROSSATO, M. **Avaliação do copépode *Acartia tonsa* como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos.** Comparação entre diferentes espécies utilizadas no Brasil. 2008. Trabalho de Graduação (Graduação em Oceanologia) – Faculdade de Oceanologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

ROQUE, M. R. A. **Isolamento, caracterização e ecologia de *Acinetobacter baumannii* degradadora do herbicida Diuron.** 2000. Rio Claro. 108 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

SABATINI M. E. The developmental stages (copepodis I to VI) of *Acartia tonsa* Dana, 1849 (Copepoda, Calanoida). **Crustaceana**, 59: 53-61, 1990.

SANDERS, H.O., 1969, Toxicity of pesticides to the crustacean *Gammarus lacustris*.: **Technical Papers of the Bureau of Sport Fisheries and Wildlife**, No. 25, Washington, D.C.:18p. (90105)

SCHATZBERG P. Organotin Antifouling Hull Paints and the U.S. Navy - A Historical Perspective. **Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference.**, 4: 1324-1333, 1987.

SOSNOWSKI, S.L., AND J.H. GENTILE. Toxicological comparison of natural and cultured populations of *Acartia tonsa* to cadmium, copper, and mercury. **J.Fish.Res.** 35(10):1366-1369, 1978.

STØTTRUP J. e NORSKER N. H. Støttrup, J.G. and N.H. Norsker. (1997) Production and use of copepods in marine fish larviculture. **Aquaculture**, 155: 235-251, 1997.

STØTTRUP J. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. **Aquaculture Research**, 31: 703-711, 2000.

SULLIVAN, B.K., AND P.J. RITACCO. Ammonia toxicity to larval copepods in eutrophic marine ecosystems: a comparison of results from bioassays and enclosed experimental ecosystems. **Aquat.Toxicol.** 7(3):205-217, 1985.

THOMAS K. V.; BLAKE S. J., e WALDOCK M. J. Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**, 40: 739-745, 2000.

THOMAS K. V. The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: a review. **Biofouling**, 17: 73-86, 2001.

THOMAS K.; FILEMAN T.; READMAN J., e WALDOCK M. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. **Marine Pollution Bulletin**, 42: 677-688, 2001.

TIXIER, C., BOGAERTS, P., SANCELME, M., BONNEMOY, F., TWAGILIMANA, L., CUER, A., BOHATIER, J., VESCHAMBRE, H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. **Pest Manage. Sci.** 56, 455–462, 2000.

TIXIER, C., SANCELME, M., AIT-AISSA, S., WIDHEM, P., BONNEMOY, F., CUER, A., TRUFFAUT, N., VESCHAMBRE, H. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. **Chemosphere** 46, 519–526, 2002.

TIXIER, C., SANCELME, M., BONNEMOY, F., CUER, A., VESCHAMBRE, H., 2001. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. **Environ. Toxicol. Chem.** 20, 1381–1389.

TOLOSA I.; READMAN J. W.; BLAEVOET A.; GHILINI S.; BARTOCCI J., e HORVAT M. Contamination of Mediterranean (Cote d'Azur) coastal waters by organotins and irgarol 1051 used in antifouling paints. **Marine Pollution Bulletin**, 32: 335-341, 1996.

WAUCHOPE R. D. The Pesticide Content of Surface Water Draining from Agricultural Fields—A Review. **J Environ Qual** 7:459-472, 1978.

WALSH, G.E., AND T.E. GROW. Depression of carbohydrate in marine algae by urea herbicides. **Weed Sci.** 19(5):568-570, 1971.

WARD, G.S., AND L. BALLANTINE. Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna. **Estuaries** 8(1):22-27, 1985.

WESSELS, JS; VAN DER VEEN, R. The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1, 1-dimethylurea on the hill reaction. **Biochim biophys acta.** mar; 19(3):548–549, 1956.

YEBRA D. M.; KIIL S., e DAM-JOHANSEN K. Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, 50: 75-104, 2004.

YOUNG CFT. The Fouling and Corrosion of Iron Ships: Their Causes of Prevention, with Mode of Application to the Existing Iron-Clads. London: **The London Drawing Association**, 1867.

ZAGATTO P. A.; BERTOLETTI E. **Ecotoxicologia Aquática**. Princípios e aplicações 2.ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486p.

ZHANG A. Q.; LEUNG K. M. Y.; KWOK K. W. H.; BAO V. W. W., e LAM M. H. W. Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. **Marine Pollution Bulletin**, In Press, Corrected Proof: 2008.

ZHOU JL, FILEMAN TW, EVANS S, DONKIN P, MANTOURA RFC, ROWLAND SJ. Seasonal distribution of dissolved pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Humber estuary and Humber coastal zone. **Mar Pollut Bull**;32:599– 608, 1996.