

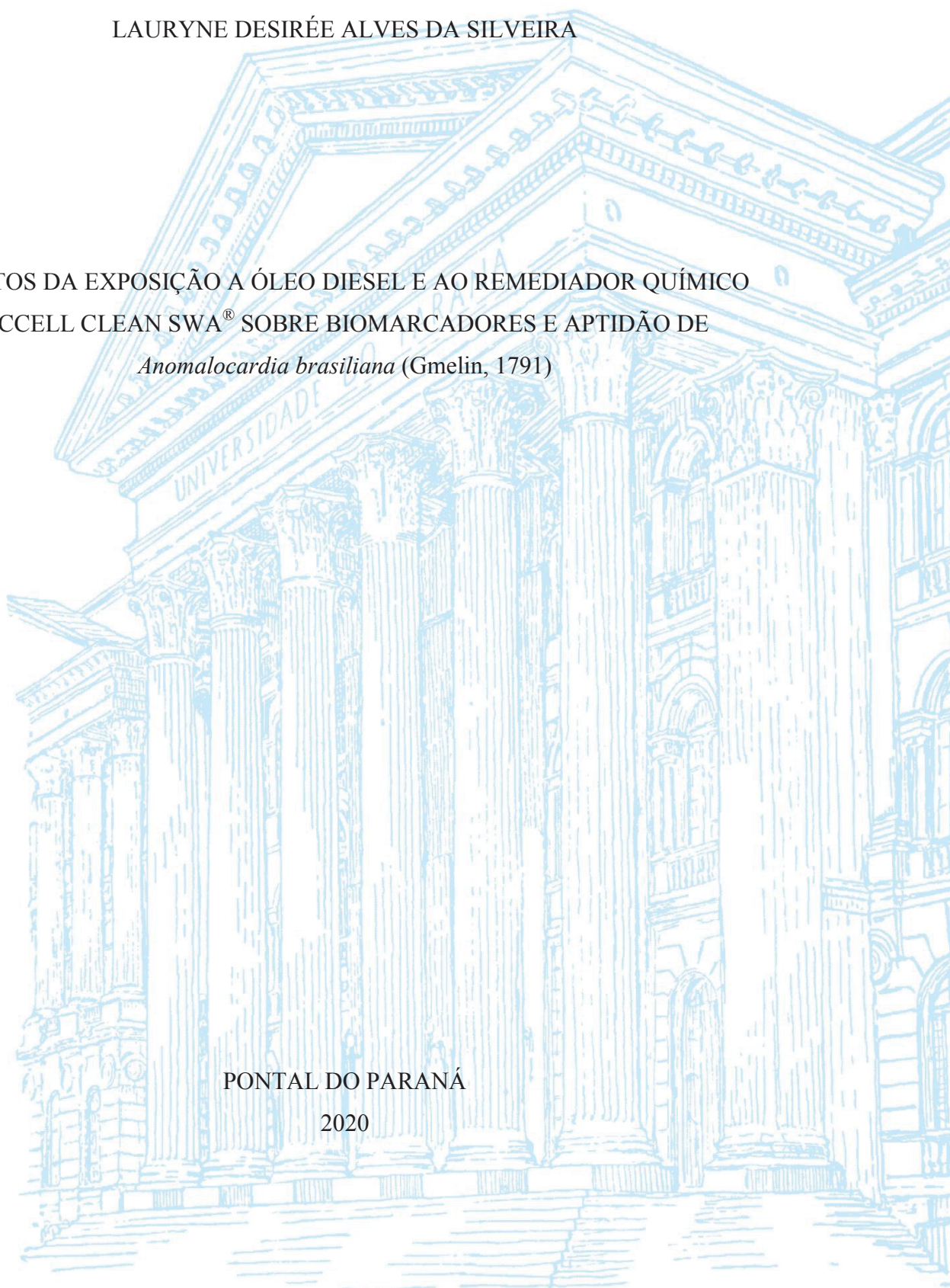
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURYNE DESIRÉE ALVES DA SILVEIRA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A ÓLEO DIESEL E AO REMEDIADOR QUÍMICO
ACCELL CLEAN SWA[®] SOBRE BIOMARCADORES E APTIDÃO DE
Anomalocardia brasiliiana (Gmelin, 1791)

PONTAL DO PARANÁ

2020



LAURYNE DESIRÉE ALVES DA SILVEIRA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A ÓLEO DIESEL E AO REMEDIADOR QUÍMICO
ACCELL CLEAN SWA[®] SOBRE BIOMARCADORES E APTIDÃO DE
Anomalocardia brasiliiana (Gmelin, 1791)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos da Universidade Federal do Paraná, *campus* Pontal do Paraná – Centro de Estudos do Mar, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Biologia e Ecologia de Sistemas Oceânicos e Costeiros

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sandrini Neto

PONTAL DO PARANÁ

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar
Fernanda Pigozzi – CRB 9/1151

S391e Silveira, Lauryne Desirée Alves da
Efeitos da exposição a óleo diesel e ao remediador químico Accell Clean SWA® sobre biomarcadores e aptidão de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791). / Lauryne Desirée Alves da Silveira. – Pontal do Paraná, 2020.
53 f.: il.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sandrini Neto.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Campus Pontal do Paraná, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.

1. Poluição – Ecologia marinha. 2. Bivalve. 3. Biomarcadores. 4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 5. Remediador químico. I. Título. II. Sandrini Neto, Leonardo. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 577.727



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
REITORIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SISTEMAS COSTEIROS
E OCEÂNICOS - 40001016054P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LAURYNE DESIRÉE ALVES DA SILVEIRA** intitulada: **Efeitos da exposição a óleo diesel e ao remediador químico Accell Clean SWA® sobre biomarcadores e aptidão de *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791)**, sob orientação do Prof. Dr. LEONARDO SANDRINI NETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Pontal do Paraná, 03 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 14:12:41.0

LEONARDO SANDRINI NETO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/04/2020 11:51:20.0

ADALTO BIANCHINI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2020 09:54:12.0

PAULO DA CUNHA LANA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Ao meu avô Sebastião, por ser um exemplo de humildade e amor

Incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e incentivo. Agradeço principalmente ao meu avô Sebastião, que sempre me auxiliou para que eu continuasse meus estudos, ao meu pai Emerson que também esteve presente me apoiando em momentos importantes e as minhas irmãs Lizandra, Loraynee e Luryane que sempre estiveram por perto e também fizeram parte desse caminho.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Leonardo Sandrini Neto pela orientação e por toda dedicação. Obrigada por fazer ciência de uma maneira humana e generosa, por acreditar em seus alunos e acreditar em mim.

Aos membros da banca, Prof^o Dr. Adalto Bianchini e Prof^o Dr. Paulo da Cunha Lana por aceitarem o convite para defesa, principalmente ao Prof^o Paulo, que foi um excelente professor durante o curso, seu exemplo como profissional foi muito importante para minha formação.

Aos Professores, Camilo Seabra Pereira, Luiz Mafra, Denis Abessa e a Prof^a Silvia Melegari por aceitarem serem membros suplentes da banca.

Aos professores da PGSISCO, agradeço por toda a dedicação, e exemplos dados durante o mestrado.

Ao professor César Martins e a equipe do seu laboratório, pela realização das análises de HPAs do projeto.

À prof^a Dr. Helena de Assis e à equipe do seu laboratório de toxicologia aquática, por me ajudarem na realização da análise da GPx.

As minhas amigas Aislyn e Estela por todo companheirismo dos trabalhos, das risadas e companhia durante a vida pontalense.

Aos meus amigos e colegas de Pontal, Serena, Andrea, Estela, Ricardo, Bruno, Cris e Kaianan, obrigada pelos roles em Pontal, as longas conversas no RU e ajudas sobre a vida acadêmica.

Aos meus amigos e colegas da turma da PGSISCO de 2018, obrigada por todos os trabalhos, dúvidas e ajudas compartilhadas.

Ao Vinicius Rogel, que me ajudou nas coletas e elaboração dos resultados.

Aos meus companheiros de laboratório, Camilla, Maiara, João, Ana, Isabel e Caio. Obrigada por todo auxílio e ajuda. De alguma forma vocês fizeram parte disso também.

A minha amiga Amanda Gerotto, pelo incentivo e indicação de fazer mestrado na PGSISCO.

A minha família de amigos, Rayane, Caroline Machado, Caroline Morgado, Thaís Alencar, Thaís de Sá, Francilene, Barbara, Rafael, Carolina, Júlia, Andressa, Alessandra, Victória, Juliana, Rebeka, Will e Ian, vocês mesmo longe foram muito importantes para a realização dessa etapa, espero contar com vocês em muitas fases da minha vida.

Aos funcionários do CEM sempre solícitos, cooperando para que tudo saísse como o planejado. Agradeço aos barqueiros, aos técnicos e a todos os funcionários do *campus* que de alguma forma ajudaram de maneira direta ou indireta.

A fundação Araucária e a CAPES pelo financiamento, com a bolsa de estudos. A empresa MARIS pelo financiamento do projeto, e aos seus colaboradores pelo atendimento em relação ao projeto de Mestrado.

Entregue, confie, aceite e agradeça.
Professor Hermógenes

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar as respostas das defesas antioxidantes e dano celular no bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, experimentalmente exposto a óleo diesel e ao remediador químico Accell Clean SWA[®]. Essas respostas foram integradas com a avaliação de crescimento e mortalidade dos indivíduos expostos em laboratório e devolvidos para o campo durante 60 dias. Os organismos foram submetidos a uma exposição aguda de 48 horas com 4 tratamentos: controle (C), controle com remediador químico (SWA), fração acomodada de óleo diesel (D), e uma fração acomodada de óleo diesel e o remediador químico (D+SWA). Após o período de exposição, os organismos foram devolvidos para o campo e monitorados ao longo de 60 dias para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, crescimento e mortalidade. As hipóteses do estudo estavam relacionadas à: 1) Diferença significativa nos parâmetros bioquímicos entre os tratamentos D e D+SWA e os controle, 2) Intensificação dos efeitos deletérios no tratamento D+SWA, em relação ao tratamento D, 3) Menor nível de crescimento e maior nível de mortalidade dos indivíduos nos tratamentos D e D+SWA em relação aos controles. A *A. brasiliiana* apresentou respostas tardias à contaminação por óleo diesel e óleo diesel com o remediador químico, com a indução da atividade da superóxido dismutase (SOD) e o aumento dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) somente no tempo de 60 dias. Os resultados apontam que o tratamento D+SWA não provocou um aumento das defesas antioxidantes e dano celular quando comparados aos tratamentos D, além de não ocorrer diferença significativa no crescimento médio dos indivíduos que pudesse ser atribuído à exposição experimental aos contaminantes, no entanto ocorreu uma mortalidade significativa nos tratamentos SWA e D+SWA, podendo indicar uma toxicidade do remediador. Esses resultados revelam uma necessidade de mais estudos que avaliem os efeitos do Accell Clean SWA[®] em áreas impactadas por petróleo e seus derivados.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; Fração acomodada de óleo diesel; Remediador químico.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the responses of antioxidant defenses and cell damage in the bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, experimentally exposed to diesel oil and the surface washing agent Accell Clean SWA[®]. These responses were integrated with the growth and mortality assessment of individuals exposed in the laboratory and returned to the field for 60 days. The organisms were subjected to an acute exposure of 48 hours with 4 treatments: control (C), control with surface washing agent (SWA), accommodated fraction of diesel oil (D), and an accommodated fraction of diesel oil and surface washing agent (D + SWA). After the exposure period, the organisms were returned to the field and monitored over 60 days to assess the parameters of oxidative stress, growth and mortality. The hypotheses of study were related to: 1) Significant difference in biochemical parameters between treatments D and D + SWA and controls, 2) Intensification of adverse effects in treatment D + SWA, about treatment D, 3) Lower level of growth and higher level of mortality of individuals in treatments D and D + SWA in relation to controls. *A. brasiliiana* showed late responses to contamination by diesel oil and diesel oil with the surface washing agent, with the induction of superoxide dismutase (SOD) activity and increased levels of reduced glutathione (GSH) only within 60 days. The results indicate that the D + SWA treatment did not cause an increase in antioxidant defenses and cell damage when compared to the D treatments, in addition there was no significant difference in the average growth of individuals that could be attributed to the experimental exposure to contaminants, however, there was a significant mortality in the SWA and D + SWA treatments, which may indicate a toxicity of the surface washing agent. These results reveal a need for more studies to assess the effects of Accell Clean SWA[®] in areas impacted by oil and derivatives.

Keywords: Oxidative stress; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Accommodated fraction of diesel oil; Surface washing agent.

HIGHLIGHTS

- The effect of diesel on *Anomalocardia brasiliiana* antioxidant defences was evaluated
- Biomarkers showed induction in treatment D, after 60 days of exposure
- The D + SWA treatment showed no greater induction of biomarkers
- There was no significant difference in growth and mortality in treatments

RESUMO EM LINGUAGEM ACESSÍVEL

Ambientes marinhos são constantemente ameaçados pela contaminação por óleo, seja por descargas contínuas ou por grandes acidentes relacionados ao petróleo e seus derivados. Uma das medidas de resposta para os derrames de petróleo e seus derivados em ambientes costeiros é aplicação de remediadores químicos. Esses produtos são utilizados para remover o óleo de superfícies presentes em praias, manguezais e costões rochosos. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos desses produtos em organismos que podem ser afetados durante o trabalho de remediação. Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de uma exposição de curto prazo a contaminantes de petróleo e avaliar também uma possível remediação. Para isso, foi realizado um experimento em laboratório por 48 horas, e após esse período os organismos foram levados para o campo e monitorados por 60 dias, para avaliação dos efeitos no crescimento, mortalidade além de danos celulares que os contaminantes de petróleo e o remediador químico provocaram no berbigão. Os resultados apontam uma defesa tardia contra os contaminantes de petróleo, além de não ocorrer diferença de medidas de crescimento e níveis de mortalidade entre os organismos expostos aos contaminantes e os organismos não expostos aos contaminantes. Esses resultados podem esclarecer e auxiliar na tomada de decisão quanto ao uso de remediadores químicos em áreas impactadas pelo óleo.

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Materiais e métodos	17
2.1 <i>Área de estudo</i>	17
2.2 <i>Delineamento experimental</i>	18
2.3 <i>Fração de óleo diesel acomodada em água (FAD) e Fração de óleo diesel e remediador quimicamente acomodado em água (FQAD)</i>	20
2.4 <i>Concentração de HPAs</i>	21
2.5 <i>Parâmetros Bioquímicos</i>	22
2.6 <i>Análise dos dados</i>	23
3. Resultados	24
3.1 <i>HPAs</i>	24
3.2 <i>Crescimento</i>	24
3.3 <i>Parâmetros Bioquímicos</i>	25
4. Discussão	31
4.1 <i>HPAs</i>	31
4.2 <i>Crescimento</i>	32
4.3 <i>Parâmetros Bioquímicos</i>	33
5. Conclusão	36
Referências	38
Resultados Suplementares	50

Effects of exposure to diesel oil and the surface washing agent Accell Clean SWA[®] on biomarkers and fitness of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791)

Lauryne D. A. da Silveira*, César C. Martins, Leonardo Sandrini-Neto

Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, PR, Brazil

* Corresponding author at: Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Av. Beira Mar s/n, 83255-976, PO Box 61, Pontal do Paraná, Paraná, Brazil. E-mail address: laurynesilveira@outlook.com (Lauryne Silveira).

Revista pretendida: Aquatic Toxicology CAPES A1 Fator de impacto: 3.794

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the responses of antioxidant defenses and cell damage in the bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, experimentally exposed to diesel oil and the surface washing agent Accell Clean SWA[®]. These responses were integrated with the growth and mortality assessment of individuals exposed in the laboratory and returned to the field for 60 days. The organisms were subjected to an acute exposure of 48 hours with 4 treatments: control (C), control with surface washing agent (SWA), accommodated fraction of diesel oil (D), and an accommodated fraction of diesel oil and surface washing agent (D + SWA). After the exposure period, the organisms were returned to the field and monitored over 60 days to assess the parameters of oxidative stress, growth and mortality. The hypotheses of study were related to: 1) Significant difference in biochemical parameters between treatments D and D + SWA and controls, 2) Intensification of adverse effects in treatment D + SWA, about treatment D, 3) Lower level of growth and higher level of mortality of individuals in treatments D and D + SWA in relation to controls. *A. brasiliiana* showed late responses to contamination by diesel oil and diesel oil with the surface washing agent, with the induction of superoxide dismutase (SOD) activity and increased levels of reduced glutathione (GSH) only within 60 days. The results indicate that the D + SWA treatment did not cause an increase in antioxidant defenses and cell damage when compared to the D treatments, in addition there was no significant difference in the average growth of individuals that could be attributed to the experimental exposure to contaminants, however, there was a significant mortality in the SWA and D + SWA treatments, which may indicate a

toxicity of the surface washing agent. These results reveal a need for more studies to assess the effects of Accell Clean SWA[®] in areas impacted by oil and derivatives.

Keywords: Oxidative stress; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Accommodated fraction of diesel oil; Surface washing agent.

1. Introdução

A liberação de óleo no ambiente marinho causa efeitos prejudiciais aos organismos desde o nível celular até níveis ecológicos superiores (NRC 2003; Egres et al., 2012). As atividades de exploração, produção, transporte e consumo de petróleo são algumas das diversas fontes de óleo nos ecossistemas marinhos, seja por meio de grandes desastres ou por vazamentos crônicos (NRC 2003; Gong et al., 2014). Apesar de uma considerável redução no número de acidentes de grandes proporções, os ambientes marinhos e costeiros continuam vulneráveis a esse tipo de distúrbio (Stevens et al., 2012).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) fazem parte da composição do petróleo e podem ser de origem pirogênica, petrogênica e biológica. Os HPAs de maior massa molecular, com mais de três anéis aromáticos, são comumente originados de fontes pirogênicas, como a combustão incompleta de material orgânico, além das emissões industriais e de veículos (Yunker et al., 2002). Os HPAs de menor massa molecular, com dois a três anéis aromáticos, são associados às fontes petrogênicas, como derramamento de petróleo e seus derivados (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). Os HPAs também podem ser biogênicos, sendo sintetizados por algumas plantas e bactérias ou formados durante a degradação de matéria orgânica (Krauss et al., 2005). Esses compostos apresentam efeitos carcinogênicos e mutagênicos (NRC 2003; Saha et al., 2009), além de uma alta toxicidade, que ocasiona diversos riscos ao meio ambiente, podendo impactar desde o nível celular até níveis ecológicos superiores (Anderson e Lee, 2006).

Organismos bênticos marinhos são considerados bons indicadores de poluição devido à sua associação com o fundo, onde os contaminantes tendem a se acumular, o que dificulta que evitem a exposição ao poluente ou outras condições adversas em sua volta (Hyland et al., 2005). Com isso, esses animais são frequentemente usados para

avaliar os danos causados por derrames de óleo, por responderem rapidamente às mudanças ambientais (Dauvin et al., 2010). Moluscos filtradores, em particular, são considerados sentinelas adequados para monitoramento ambiental devido à sua capacidade de bioacumulação de contaminantes (Solé et al., 2009).

A exposição de organismos aos xenobióticos podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) (Monserrat et al., 2007; Lüchmann et al., 2011), que também ocorrem naturalmente durante os processos metabólicos celular (Vidal-Liñán e Bellas, 2013). As EROs são subprodutos de reações de biotransformação (Reis-Henriques et al., 2009), e quando ocorrem em níveis elevados podem causar danos às proteínas, ao DNA e aos lipídios, prejudicando o funcionamento normal celular (Livingstone, 2001; Yin et al., 2007). A preservação da célula contra os danos oxidativos está ligada às defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas e não enzimáticas (Kaloyianni et al., 2009 Lüchmann et al., 2011; Turja et al., 2013). A transformação de xenobióticos no sistema biológico possui duas principais fases, que são divididas em biotransformação (Fase I) e conjugação (Fase II). O processo metabólico da fase I é descrito como reações oxidativas catalisadas pelo sistema de oxigenase de função mista (OFM), que estão ligadas ao um grupo de enzimas do citocromo P450, já a fase II é definida pela atividade da glutathione -S- transferase (Van der Oost et al., 2003).

Os HPAs estão entre os xenobióticos mais prejudiciais em ambientes aquáticos devido à sua baixa solubilidade em água e a retenção de partículas assentadas nos sedimentos (Bacosa e Inoue, 2015). O tráfego de embarcações de pequeno e médio porte em ambientes costeiros e estuarinos é responsável pela liberação de produtos derivados do petróleo com frequência e intensidade variáveis (NRC, 2003). A maioria dessas embarcações utiliza óleo diesel marítimo como combustível, que causam diversos impactos ecológicos, além dos acidentes com petróleo e seus derivados em ambientes costeiros, demandarem operações de remediação mais caras e demoradas quando comparadas a outros ambientes marinhos (Etkin, 2001).

Uma das ações de resposta para os derrames de petróleo e seus derivados em ambientes costeiros é aplicação de remediadores químicos. Esses produtos são utilizados para remover o óleo de superfícies sólidas presentes em praias, manguezais e costões rochosos (Baxter et al., 2018). A aplicação de remediadores químicos no Brasil é regulamentada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) por meio da Resolução 463/14, considerando os benefícios que podem ocorrer com o uso adequado

de remediadores na recuperação de ecossistemas contaminados (CONAMA 463/14). Contudo, pouco se sabe sobre os impactos desses produtos químicos em organismos estuarinos, que podem ser afetados durante o trabalho de remediação (Baxter et al., 2018). O Accell Clean SWA[®] é um remediador químico registrado pelo IBAMA para o uso no Brasil. Ele é composto por surfactantes e proteínas não enzimáticas que aceleram a biodegradação natural do petróleo, com a indução do consumo por bactérias, sem aumentar a biomassa bacteriana (DeLorenzo et al., 2017). Esses produtos costumam ter propriedades de elevação e dispersão e/ou elevação e flutuação (Michel e Rutherford, 2013). Os produtos de elevação e dispersão agem para emulsionar e dispersar o óleo no ambiente. Com isso, esse efluente deve ser contido e devidamente tratado. Os remediadores de elevação e flutuação são produtos que permitem que o óleo flutue sem dispersá-lo, assim as manchas de óleo que ficam na superfície podem ser recuperadas (Michel e Rutherford, 2013).

Os remediadores químicos usualmente são aplicados diretamente nas superfícies oleadas e são permitidos a penetrar por um determinado tempo para sua ação. Após a aplicação, o óleo e o remediador químico são lavados com água do ambiente, e essa água é retirada do local para evitar contaminação (Michel, et al, 2001). Os remediadores químicos geralmente são aplicados em pequenas áreas na zona entre-marés, sendo aplicados manualmente ou pulverizados por grandes veículos (Chen, et al, 2019) Os sedimentos oleados são lavados com o remediador químico e retornam à costa, enquanto a solução de lavagem usada é retida para um descarte adequado (Fingas, 2012; Lee et al, 2015; Chen et al; 2019).

A aplicação do remediador químico pode agir positivamente na recuperação do local, contudo seu uso é limitado devido à escassez de instruções e preocupações quanto ao seu possível efeito prejudicial (Chen et al, 2019). O desenvolvimento de estudos que avaliam os possíveis efeitos ambientais com a interação do óleo e os remediadores químicos é importante para elucidar a eficiência da estratégia que utilizam esses produtos (Chen et al, 2019). Com isso, este estudo teve como objetivo avaliar as respostas das defesas antioxidantes e dano celular no bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, experimentalmente exposto a óleo diesel e ao remediador químico Accell Clean SWA[®]. Adicionalmente, foram avaliadas medidas crescimento e sobrevivência dos animais previamente expostos em laboratório e devolvidos para o campo durante 2 meses. Foram testadas as seguintes hipóteses: 1) Se o óleo diesel e o óleo diesel com o

remediador químico provocam alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e de dano celular, então podem ocorrer diferenças significativas dessas respostas entre os animais experimentalmente expostos aos tratamentos com os contaminantes e o controle, 2) Se o remediador químico biodisponibilizar maiores quantidades de HPAs na coluna d'água, então o tratamento com diesel e o remediador químico pode provocar uma maior resposta nas defesas antioxidantes do que o tratamento com apenas diesel, 3) Se o óleo diesel e o óleo diesel com o remediador químico afetam o crescimento e a sobrevivência de *A. brasiliiana*, então os organismos expostos a esses tratamentos em laboratório e posteriormente devolvidos para o campo, podem apresentar, ao longo de 60 dias, menores taxas de crescimento e maiores níveis de mortalidade, quando comparados com os indivíduos do grupo controle.

Pretende-se com os resultados deste estudo auxiliar na tomada de decisão quanto ao uso de remediadores químicos em áreas impactadas pelo óleo. Por meio de experimentos manipulativos em campo e laboratório, foram integradas as respostas de crescimento e um conjunto parâmetros bioquímicos no bivalve *A. brasiliiana*.

2. Materiais e métodos

2.1 Área de estudo

Os organismos foram coletados e devolvidos para o campo em uma planície entre-marés na Ilha de Papagaios (25°30'30,2 S; 48°28'9.7 W), localizada no subestuário polihalino do Canal da Cotinha (Fig. 1). O regime de maré nessa região é semidiurno com desigualdades diurnas e a amplitude da maré pode atingir 1,7 m (Lana et al., 2001; Marone et al., 2005). O sedimento é composto por areias finas e bem classificadas (Souza et al., 2013), que é normalmente coberto com biofilmes de diatomáceas ou algas marinhas (Fonseca et al., 2013).

O subestuário do Canal da Cotinha é uma das rotas de descargas de esgoto da cidade de Paranaguá (Barboza et al., 2013; Souza et al., 2013), além de outras fontes de impacto que incluem atividades industriais relacionadas a um terminal de petróleo, um porto de grãos e o turismo, que podem contribuir para um aumento do descarte de derivados do petróleo, esgotos domésticos e industriais, metais pesados e poluentes orgânicos (Abreu-Mota et al., 2014). Apesar dessas fontes de contaminação, o

sedimento do subestuário da Cotinga, onde fica localizada a Ilha dos Papagaios, é considerado não contaminado por HPAs, quando comparado com outras regiões urbanizadas, como o estuário de Santos e a Baía de Guanabara (Cardoso et al., 2016; de Abreu-Mota et al., 2014).

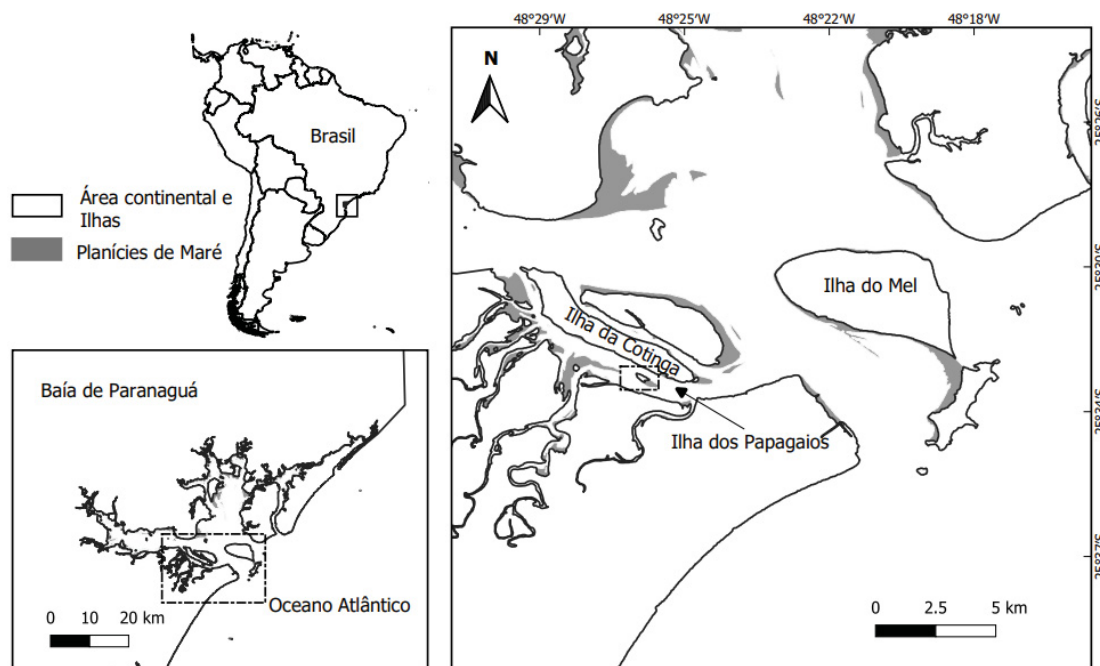


Fig. 1. Mapa da Baía de Paranaguá indicando o local de coleta dos organismos e a planície de maré utilizada para o experimento.

2.2. Delineamento experimental

Foram coletados 600 indivíduos de *A. brasiliiana* na planície de maré da Ilha dos Papagaios, em abril de 2019. Os organismos foram levados para o laboratório e aclimatados por 48 horas em um tanque com 50 litros de água marinha filtrada (25 de salinidade, 20 °C), aeração constante e fotoperíodo de 16h:8 h L/E. O comprimento médio dos organismos coletados foi de 18,1 mm, medido no eixo ântero-posterior com um paquímetro com precisão de 0,05 mm. Os indivíduos não foram alimentados durante o experimento de laboratório e tempo de aclimação.

O experimento consistiu em quatro tratamentos: controle (C; apenas água do mar), controle do remediador químico (SWA; água do mar com adição do remediador químico Accell Clean SWA[®]), óleo diesel disperso mecanicamente (D; óleo diesel misturado à água do mar por agitação), e óleo diesel com o remediador químico Accell

Clean SWA[®] (D+SWA). Para as concentrações dos tratamentos de óleo diesel e óleo diesel com remediador químico foram feitas com uma fração de óleo diesel acomodada em água e uma fração de óleo diesel e o remediador quimicamente acomodada em água. A exposição em laboratório foi definida para um melhor controle das soluções testes e dos parâmetros físico-químicos do experimento. Os quatro tratamentos experimentais foram aleatoriamente alocados em 12 aquários (três aquários por tratamento), aos quais foram adicionados 50 indivíduos (total de 150 organismos por tratamento) de *Anomalocardia brasiliana* para a exposição de 48 h em laboratório. Após a exposição, cinco indivíduos de cada réplica dos tratamentos foram retirados para análise de biomarcadores. As glândulas digestivas de *A. brasiliana* foram armazenadas a -80 °C até a realização das análises.

Após o período em laboratório, os indivíduos remanescentes foram devolvidos para o campo no mesmo local em que foram coletados para a avaliação dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos desses animais após a contaminação. Os organismos devolvidos para o campo foram divididos em dois grupos: o primeiro para a avaliação dos parâmetros bioquímicos durante 60 dias. Os 4 tratamentos tinham 35 organismos em cada uma de suas 3 réplicas (105 indivíduos por tratamento). Esses indivíduos foram alocados em câmaras de ensaio, tal como descritas por Díaz-Jaramillo et al. (2013) com 8 organismos por câmara. Ao longo do experimento foram realizadas 4 coletas no período de 10 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias. A cada coleta eram retiradas 3 câmaras replicadas de cada tratamento para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. O segundo grupo era composto por 10 organismos em cada uma das três réplicas (30 indivíduos por tratamento), onde foram alocados no campo dentro da câmara de ensaio, para serem medidos com um paquímetro, durante os 4 tempos para a análise do crescimento. Os organismos foram identificados com marcações de esmalte de colorações diferentes para cada tratamento. Durante o experimento, eram considerados mortos os animais que estavam com a concha aberta, além de ser observado o movimento do sifão como um sinal de vitalidade dos organismos que estavam vivos no experimento.

O experimento totalizou 48 câmaras de ensaio para a análise dos parâmetros bioquímicos, com retiradas parciais depois nos tempos de 10, 30, 45 e 60 dias, além de 12 câmaras de ensaio para a medição do comprimento dos indivíduos. O experimento ocupou uma área de 10 × 8 m no campo, dividida em 60 parcelas de 1 × 1 m em 6 filas com 10 parcelas, com cada tratamento disposto aleatoriamente dentro de uma câmara de

ensaio no centro de cada parcela (Fig.2). A cada 2 filas havia um corredor de um metro de largura, para facilitar a movimentação e impedir a perturbação das unidades experimentais devido ao pisoteio durante a retirada das amostras. Em todos os tempos, foram coletados 5 indivíduos adultos de *A. brasiliiana* para análise dos parâmetros bioquímicos fora dos tratamentos, como um controle do campo.

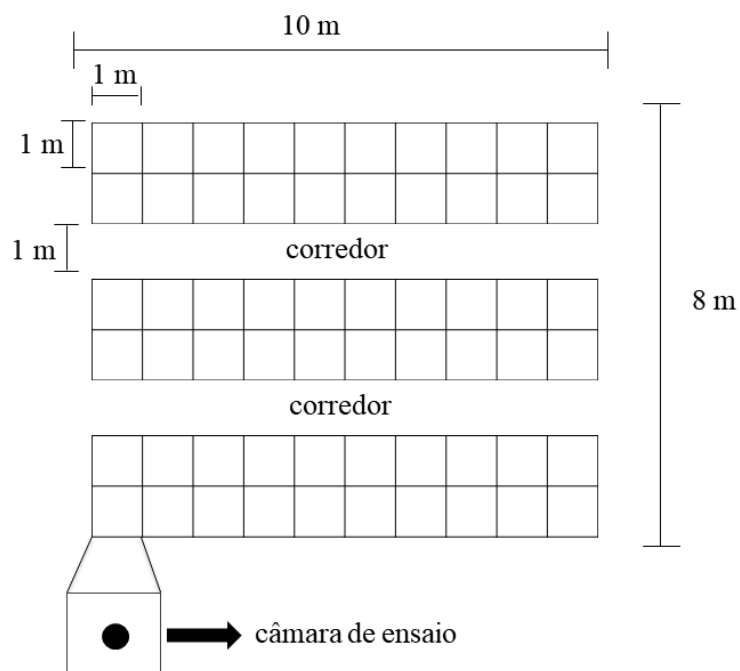


Fig. 2. Delineamento experimental das 60 parcelas dispostas na planície de maré na Ilha dos Papagaios.

2.3. Fração de óleo diesel acomodada em água (FAD) e Fração de óleo diesel e remediador quimicamente acomodado em água (FQAD)

O remediador químico Accell Clean SWA[®] registrado pelo IBAMA para uso no Brasil, foi cedido pela empresa Verus Ambiental. O óleo diesel foi comprado diretamente em uma estação de abastecimento marítimo local. Ambos foram armazenados protegidos da luz a 20 °C. Para a realização da fração de óleo diesel acomodada em água, foi seguida a metodologia de Hemmer et al. (2011). A fração foi realizada em um ambiente limpo, com a adição de 16 litros de água marinha filtrada com 25 de salinidade. Para a agitação da solução, foi utilizada uma bomba submersa com uma circulação de baixa energia. No centro do vortex foram adicionados 25g de

óleo diesel por litro de água. A fração foi tampada e mantida no escuro durante 18 h de agitação e 6 h de repouso. Após esse tempo, foi retirada a fração de água acomodada sem perturbar a camada superficial de óleo. A preparação da fração do remediador e óleo diesel quimicamente acomodada em água seguiu a metodologia acima, com a adição de 2,5 g/l do remediador químico Accell clean SWA[®] e 25 g/l do óleo diesel (diluição 1:10) de acordo com Baxter et al. (2018).

Um teste preliminar nas concentrações de 5%, 25%, 50%, 75% e 100% das frações (FAD) e (FQAD) foi realizado, com a adição de 20 organismos para cada concentração durante 96 horas. Após o período de exposição, o percentual de mortalidade foi observado, para definir a maior concentração que tivesse uma mortalidade igual ou inferior a 10% para evitar que faltasse material ao longo do experimento. Nessas condições, a concentração de 50% das soluções preparadas foi definida para os tratamentos de óleo diesel (D) e óleo diesel e o remediador químico (D+SWA). Um tratamento apenas com o Accell Clean SWA[®], na concentração de 2,5g/l foi feito, para representar um controle do remediador químico.

2.4. Concentração de HPAs

A concentração de HPAs foi determinada para todos os tratamentos ao final do período de exposição. Para isso, aproximadamente 200 mL de água foram coletadas de cada grupo e armazenadas a -20 °C em garrafas de vidro âmbar. A metodologia aplicada para medidas de HPAs nos tratamentos foi descrita por UNEP (1992) e Martins et al. (2011). Para esse trabalho, foram analisados os 16 HPAs prioritários, classificados pela USA (2001) [HPAs com 2-3 anéis: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno; HPAs com 4-6 anéis: fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno e HPAs alquilados: C1-, C2-C3-naftalenos e C1-fenantreno].

As amostras de águas foram extraídas por 8 h com 80 mL de uma mistura (1:1) de n-hexano/diclorometano (DCM). Para avaliar o método analítico e quantificar os HPAs, foram adicionados em cada balão de extração padrões substitutos (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12). O extrato foi purificado por cromatografia em coluna usando alumina e sílica desativada a 5%. Os

hidrocarbonetos foram removidos eluindo 15 mL de uma mistura de 30% de DCM em n-hexano. A fração foi concentrada em um evaporador rotativo a vácuo e o extrato resultante foi armazenado para a identificação e quantificação dos HPAs. O extrato final foi utilizado para a análise de cromatografia gasosa em um cromatograma GC Agilent (modelo 6890) acoplado a um detector de espectrômetro de massa Agilent (MSD inerte Agilent 5975C com detector de eixo triplo) e uma coluna capilar de sílica fundida. O hélio foi usado como gás de arraste. Os HPAs foram identificados por tempos de retenção adequados e fragmentos de massa iônica com misturas padrões.

2.5. Parâmetros bioquímicos

Um pool de aproximadamente 100 mg de glândula digestiva foi homogeneizado (1:10 peso/volume) em buffer de fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0), com auxílio de um homogeneizador IKA T10 Ultra-Turrax. O homogenato foi centrifugado a 15.000g por 30 minutos (4°C) e o sobrenadante foi aliquoteado em microtubos tipo *Eppendorf* e armazenado a -80°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar o teor de proteínas, as atividades de superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e níveis de glutathione reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO). A concentração total de proteínas foi medida a 595 nm, seguindo o método de Bradford (1976), com albumina de soro bovino como padrão. Para a atividade da glutathione S-transferase (GST), as amostras foram diluídas para 1 mg/ml proteína. A atividade de (GST) foi medida a 340 nm, de acordo com o método de Keen et al. (1976), usando 3 mM de cloro-2,4-dinitrobenzeno e glutathione. Para superóxido dismutase (SOD), as amostras foram diluídas para 1:10 v/v em buffer de fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0). A atividade da SOD foi medida a 440 nm, usando tampão Tris / EDTA (1 M / 5 mM; pH 8,0), ácido pirogálico 15 mM e HCl 1 N, de acordo com Gao et al. (1998). A atividade de GPx foi medida 340 nm, segundo Hafeman et al. (1974), usando tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 7), NaN₃ 2 mM, NAPH 0,2 mM, GSH 2 mM e GR 1µM. Os níveis de glutathione reduzida (GSH) foram medidos a 405 nm, de acordo com Sedlak e Lindsay (1968), usando o tampão Tris-Base (0,4 M; pH 8,9), soluções de 50% e 10% ácido tricloro acético, 10 mM e 2,5 mM de (DTNB). Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram medidos a 570 nm, segundo o método de Jiang et al. (1992), usando laranja de xilenol 100 µM, H₂SO 25 mM, BHT 4,4 µM, sulfato

ferroso amoniacal 250 μM e metanol. Todas as leituras foram feitas com um leitor de microplacas BioTek Elx 808.

2.6. Análise dos dados

Variações nas taxas de crescimento dos espécimes devolvidos para o campo foram avaliadas por uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas com Tratamento (quatro níveis, fixo: C, SWA, D, D+SWA) e Tempo (quatro níveis, fixo: 10, 30, 45 e 60 dias; ortogonal a Tratamento) como fatores. O teste de Mauchly foi aplicado para avaliar o pressuposto da esfericidade e, diante de sua violação, a correção de Greenhouse-Geisser foi aplicada. Comparações múltiplas *a posteriori* foram conduzidas nos termos significativos do modelo, com o nível de significância α ajustado pela correção de Holm.

A diferença na taxa de mortalidade entre tratamentos (C, SWA, D, D+SWA) durante o período de 60 dias foi analisada por um teste de igualdade de proporções. No caso de rejeição da hipótese nula de que a probabilidade de morte não difere significativamente entre tratamentos, comparações múltiplas *a posteriori* foram conduzidas com α ajustado pela correção do Holm.

As diferenças na atividade da SOD, GST, GPx e nos níveis de LPO e GSH foram testados individualmente por modelos lineares mistos com a seguinte estrutura: Tratamento (Tr, fixo, quatro níveis: C, SWA, D, D+SWA;), Tempo (Ti, fixo, cinco níveis: 48 h, 10, 30, 45, 60 dias; ortogonal a Tr). Mesmo após transformação, os dados apresentaram-se extremamente heterocedásticos, então os modelos foram construídos com diferentes estruturas de variância para Tratamento, Tempo e sua interação. Após determinar a melhor estrutura de variância, a estrutura de efeitos fixos foi definida. Todo o processo de seleção foi fundamentado na significância dos termos do modelo e no critério de informação Akaike (AIC) conforme o protocolo descrito por Zuur et al. (2009). Termos significativos da estrutura fixa ($\alpha = 0,05$) foram testados por comparações post-hoc de médias de mínimos quadrados. A validação dos modelos selecionados foi realizada a partir de gráficos diagnósticos de normalidade dos resíduos e homogeneidade conforme recomendado por Zuur et al. (2009).

Todas as análises estatísticas e os gráficos foram produzidos no ambiente R (R Core Team, 2019) com auxílio dos pacotes ez (Lawrence, 2016), nlme (Pinheiro et al., 2019), emmeans (Lenth, 2020) e ggplot2 (Wickham, 2016).

3. Resultados

3.1. HPAs

Os valores relativos às concentrações totais de HPAs (Σ HPAs) em todos os tratamentos constam na Tabela 1. As concentrações totais de HPAs variaram de 0,39 (no controle) a 17,07 $\mu\text{g/l}$ (no tratamento D+SWA).

Tabela 1: Concentrações ($\mu\text{g/l}$) de HPAs na água exposta aos tratamentos experimentais. Σ HPAs hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais ($\mu\text{g/l}$), totais de Alquilados HPAs ($\mu\text{g/l}$), totais de HPAs com 2 – 3 anéis ($\mu\text{g/l}$); totais de HPAs com 4 – 6 anéis ($\mu\text{g/l}$).

	C	SWA	D	D + SWA
Σ HPAs	0,39	1,36	2,58	17,07
Alquilado	0,10	0,22	1,70	11,80
2 – 3 anéis	0,29	0,51	0,76	4,51
4 – 6 anéis	n.d.	0,63	0,12	0,76

n.d.= Não detectado

As concentrações de HPAs Alquilados encontram-se de 0,10 $\mu\text{g/l}$ (Controle) a 11,80 $\mu\text{g/l}$ (D+SWA). Os HPAs Alquilados apresentaram maiores concentrações na água dos tratamentos D e D+SWA, indicando origem petrogênica (Saha et al., 2009), por derreamento direto do contaminante. As concentrações de HPAs com 2 – 3 anéis, permaneceram de 0,29 $\mu\text{g/l}$ a 4,51 $\mu\text{g/l}$, indicando uma maior contaminação desses compostos, em relação aos HPAs de 4 – 6 anéis, que tem sua origem em fontes pirogênicas (0,63 $\mu\text{g/l}$ a 0,76 $\mu\text{g/l}$).

3.2 Crescimento e mortalidade

Não foram detectadas diferenças significativas no tamanho médio de *A. brasiliensis* entre tratamentos (Fig. 3) (ANOVA de medidas repetidas, $gl = 3,8$; $F = 1,72$; $P > 0,05$), nem na interação entre tratamentos e tempos ($gl = 9,24$; $F = 0,51$; $P > 0,05$).

O tamanho médio de *A. brasiliiana* diferiu forma significativa entre tempos após a exposição ($gl = 3,24$; $F = 14,67$; $P < 0,001$). Comparações *a posteriori* revelaram uma diferença significativa no tamanho médio dos indivíduos entre os tempos de 10 e 60 dias.

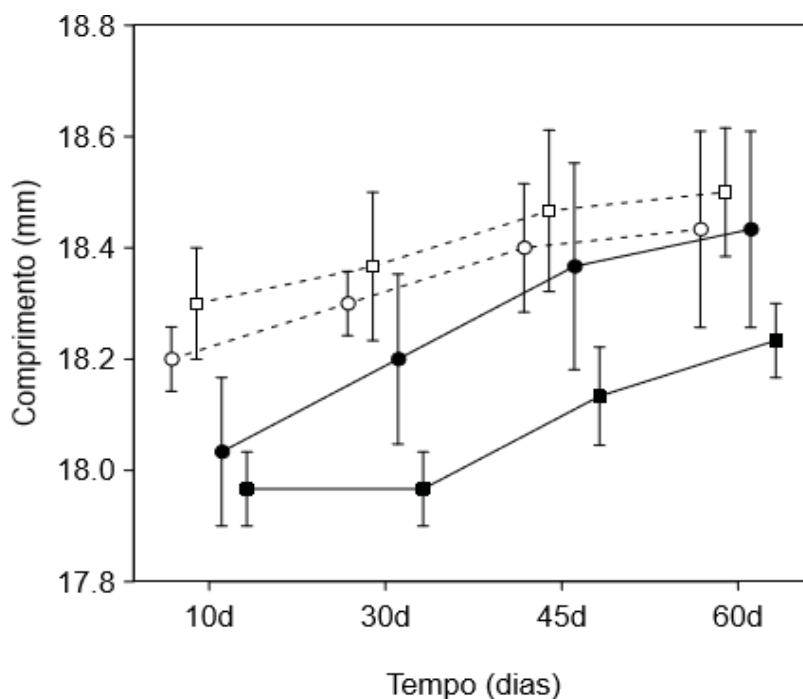


Fig. 3. Tamanho médio (\pm erro-padrão) de *Anomalocardia brasiliiana* nos tempos de 10, 30, 45 e 60 dias. Os tratamentos são identificados por: Controle (C, círculos brancos), apenas o remediador químico (SWA, quadrados brancos), apenas óleo diesel (D, círculos preto) e óleo diesel com o remediador químico (D+SWA, quadrados pretos).

A probabilidade de morte variou significativamente entre tratamentos durante o período de 60 dias (teste de igualdade de proporções, $gl = 3$; $\chi^2 = 16,42$; $P < 0,001$). Comparações *a posteriori* revelaram diferenças significativas na proporção de indivíduos mortos entre o tratamento C (0%) e os tratamentos SWA (9,3%) e D+SWA (7,3%), que não diferiram entre si. A proporção de mortos em D (3,3%) não diferiu da observada nos demais tratamentos.

3.3 Parâmetros bioquímicos

As atividades da SOD (Tabela 2; Fig.4) e GPx (Tabela 2; Fig.5) e os níveis de GSH (Tabela 2; Fig.7) apresentaram diferenças significativas na interação entre tratamento e tempo. Os níveis de LPO variaram significativamente entre tempos (Tabela 2; Fig.8), enquanto a atividade da GST não apresentou diferenças significativas (Tabela 2; Fig.6)

Tabela 2. Modelos lineares ajustados para os diferentes parâmetros de estresse oxidativo. Para cada parâmetro, a estrutura da variância dos modelos selecionados é apresentada no primeiro painel. A estrutura fixa dos modelos selecionados é apresentada no segundo painel (Tr = Tratamento, Te = Tempo), juntamente com a análise de variância e testes post-hoc das médias dos mínimos quadrados entre tratamentos (C = controle, SWA = remediador, D = diesel, D+SWA = diesel com remediador) e tempos (48h, 10d, 30d, 45d, 60d). Nas comparações post-hoc letras distintas indicam $P < 0.05$ e letras iguais indicam $P > 0.05$.

SOD				GPx					
<i>Estrutura da variância: ~ 1 Tr</i>				<i>Estrutura da variância: ~ 1 Tr*Te</i>					
C	SWA	D	D+SWA	C	SWA	D	D+SWA		
1.000	0.669	1.389	2.065	48h	1.000	0.158	0.920		
				10d	1.128	1.720	0.063		
				30d	0.339	0.166	0.557		
				45d	1.413	0.064	0.656		
				60d	0.069	0.690	1.181		
<i>Estrutura dos efeitos fixos: SOD ~ Tr*Te</i>				<i>Estrutura dos efeitos fixos: GPx ~ Tr*Te</i>					
Fonte	df _{num} /df _{den}	F	P	Fonte	df _{num} /df _{den}	F	P		
Tr	3/40	0.5506	0.6507	Tr	3/40	33.9703	< 0.001		
Te	4/40	25.1271	< 0.001	Te	4/40	21.7677	< 0.001		
Tr*Te	12/40	1.8526	0.0720	Tr*Te	12/40	21.5049	< 0.001		
Post-hoc: entre níveis de Tr para cada nível de Te				Post-hoc: entre níveis de Tr para cada nível de Te					
	C	SWA	D	D+SWA		C	SWA	D	D+SWA
48h	a	a	a	a	48h	a	a	a	a
10d	a	a	a	a	10d	a	a	a	a
30d	a	a	a	a	30d	ab	a	bc	c
45d	a	a	a	a	45d	a	a	a	a
60d	a	a	b	ab	60d	a	a	a	a
GST				GSH					
<i>Estrutura da variância: homogênea</i>				<i>Estrutura da variância: homogênea</i>					
<i>Estrutura dos efeitos fixos: GST ~ 1</i>				<i>Estrutura dos efeitos fixos: GSH ~ Tr*Te</i>					

Fonte	df _{num} /df _{den}	F	P	Fonte	df _{num} /df _{den}	F	P
Tr	3/40	0.3415	0.7954	Tr	3/40	1.7802	0.1664
Te	4/40	0.3851	0.8180	Te	4/40	12.8689	< 0.001
Tr*Te	12/40	1.0381	0.4350	Tr*Te	12/40	2.3111	0.0236

Post-hoc: entre níveis de **Tr** para cada nível de **Te**

	C	SWA	D	D+SWA
48h	a	a	a	a
10d	a	a	a	a
30d	a	a	a	a
45d	a	a	a	a
60d	a	a	b	ab

LPO

*Estrutura da variância: ~ 1|Tr*Te*

	C	SWA	D	D+SWA
48h	1.000	0.723	0.461	0.445
10d	0.749	0.400	0.328	0.115
30d	0.456	0.256	0.451	0.106
45d	0.102	0.120	0.015	1.035
60d	0.674	0.145	0.684	0.172

Estrutura dos efeitos fixos: LPO ~ Te

Fonte	df _{num} /df _{den}	F	P
Te	4/55	12.1790	< 0.001

Post-hoc: entre níveis de **Te**

48h	10d	30d	45d	60d
a	a	a	b	a

Para SOD, a única diferença significativa, em relação ao controle, ocorreu no tratamento D no tempo de 60 dias (Tabela S2; Fig. 4).

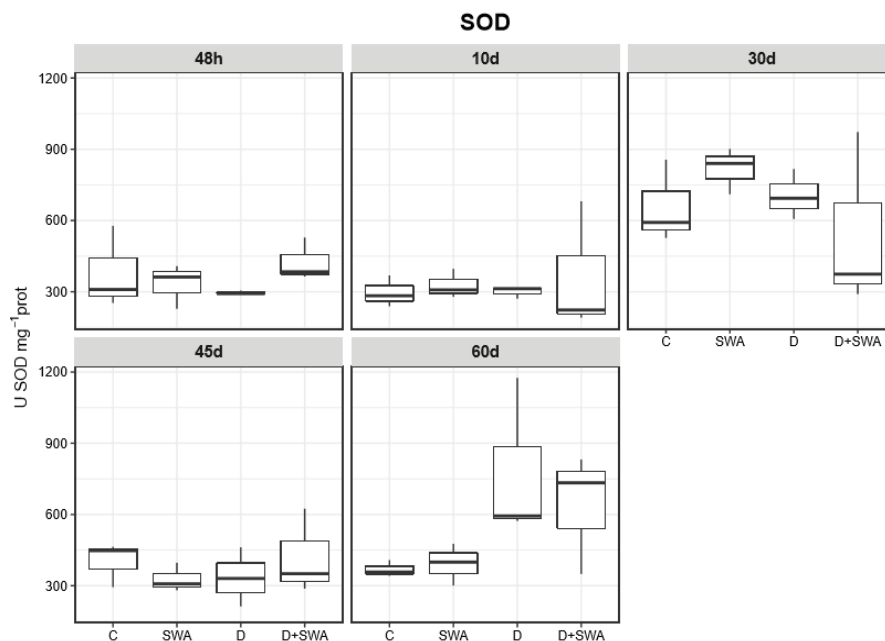


Fig. 4. Atividade de superóxido dismutase (SOD) nos tratamentos controle (C), remediador químico (SWA), óleo diesel (D) e óleo diesel com o remediador químico (D+SWA) nos tempos de 48 h, 10 d, 30 d, 45 d, 60 d.

A atividade da GPx variou significativamente na interação entre tratamentos e tempos. Comparações *a posteriori* revelaram uma indução nos tratamentos C e SWA no tempo de 30 dias (Tabela 2; Fig. 5).

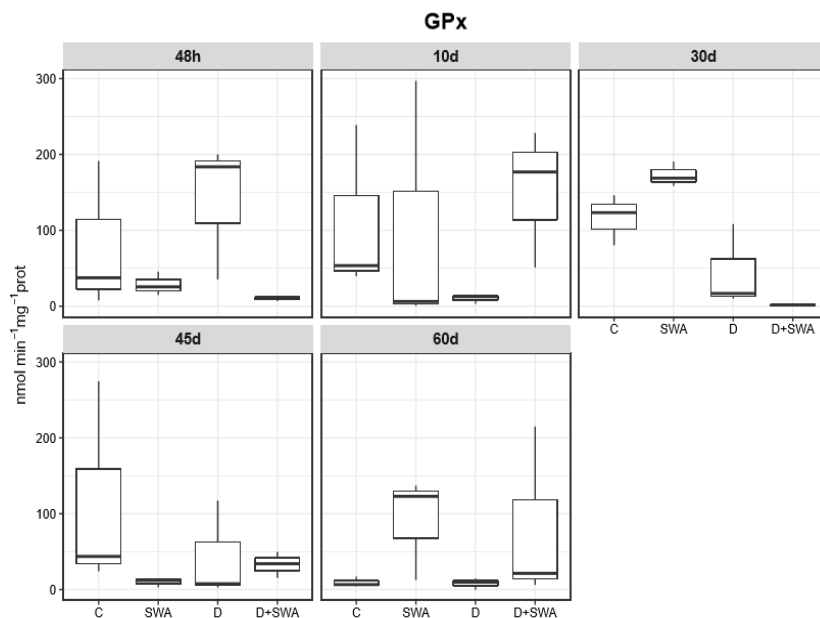


Fig. 5. Atividade de glutatona peroxidase (GPx) nos tratamentos controle (C), remediador químico (SWA), óleo diesel (D) e óleo diesel com o remediador químico (D+SWA) nos tempos de 48 h, 10 d, 30, 45, 60 d.

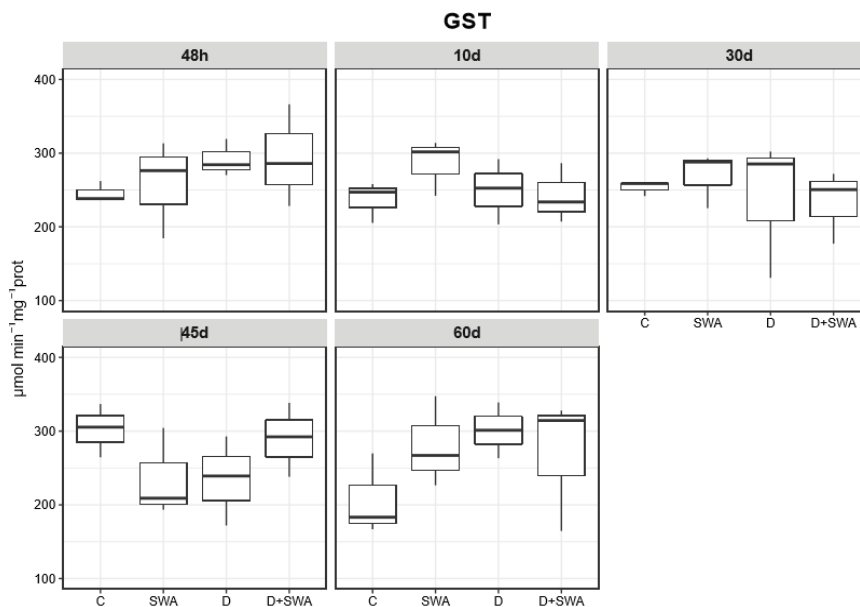


Fig. 6. Atividade de glutationa-S-transferase (GST) nos tratamentos controle (C), remediador químico (SWA), óleo diesel (D) e óleo diesel com o remediador químico (D+SWA) nos tempos de 48 h, 10 d, 30 d, 45 d, 60 d.

Com 60 dias da exposição, os níveis de GSH aumentaram nos tratamentos D e D+SWA, contudo, comparações *a posteriori* das médias revelaram que apenas o tratamento D teve médias com diferença significativa em relação ao controle e ao controle do remediador (Tabela 2; Fig. 7).

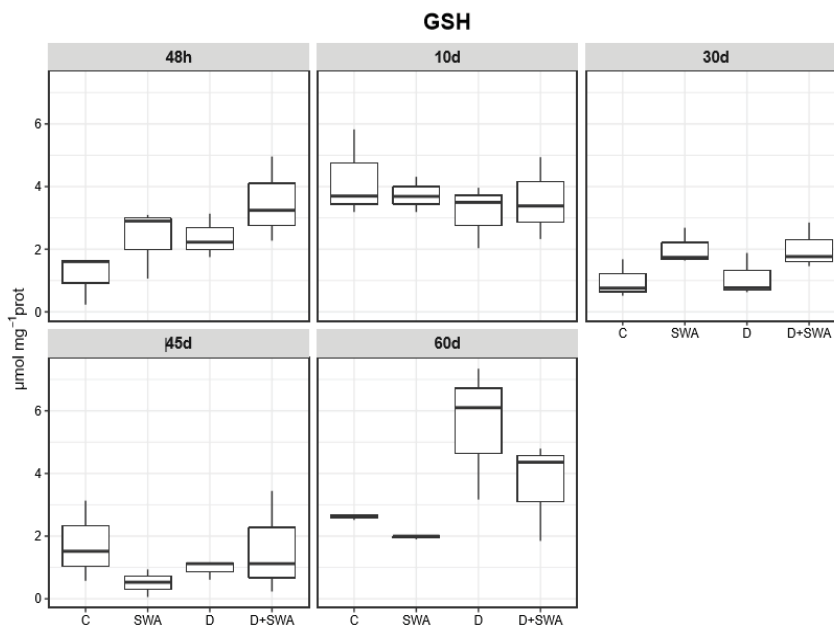


Fig. 7. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) nos tratamentos controle (C), remediador químico (SWA), óleo diesel (D) e óleo diesel com o remediador químico (D+SWA) nos tempos de 48 h, 10 d, 30, 45, 60 d.

Os níveis de LPO apresentaram variações apenas entre os tempos, não diferindo entre os tratamentos (Tabela 2; Fig. 8). Os níveis de LPO foram significativamente menores no tempo de 45 dias, não sendo diferente entre os demais períodos considerados.

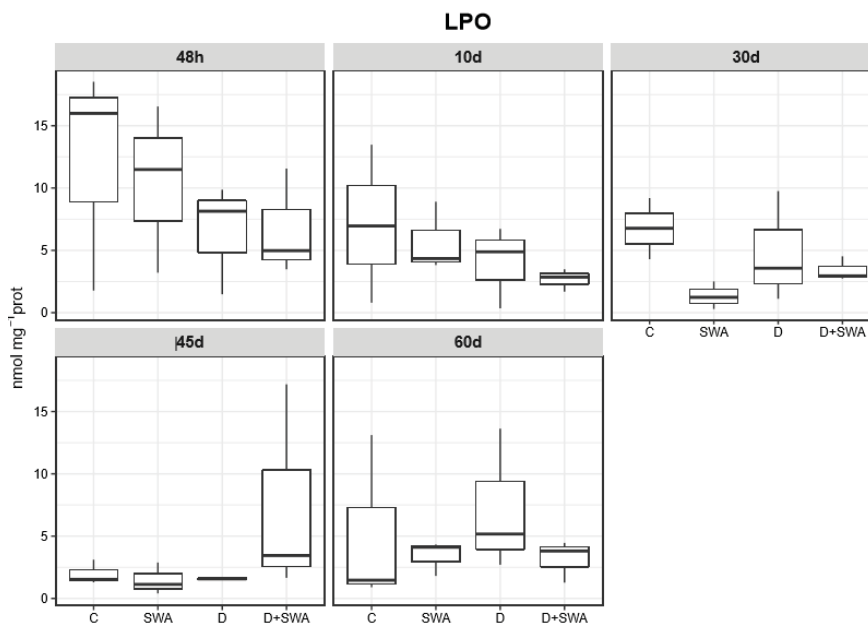


Fig. 8. Níveis de peroxidação lipídica (LPO) nos tratamentos controle (C), remediador químico (SWA), óleo diesel (D) e óleo diesel com o remediador químico (D+SWA) nos tempos de 48 h, 10 d, 30, 45, 60 d.

4. Discussão

4.1 HPAs

As concentrações totais de HPAs nos tratamentos com adição de diesel foram de 2,58 $\mu\text{g/l}$ para o tratamento D e 17,07 $\mu\text{g/l}$ para o tratamento D+SWA. Essa diferença indica que o remediador biodisponibilizou mais HPAs no tratamento D+SWA. De acordo com Chen et al. (2004), locais altamente poluídos por HPAs, por meio de fontes pontuais industriais, deposição atmosférica e escoamento urbano possuem níveis superiores 10 $\mu\text{g/l}$, indicando que o tratamento D+SWA está altamente contaminado por esses compostos.

As concentrações encontradas nos controles se estabeleceram entre 0,39 $\mu\text{g/l}$ para o controle C e 1,36 $\mu\text{g/l}$ para o controle SWA, apontando baixas concentrações de HPAs, e por conseguinte, uma não contaminação dos tratamentos (valores < 10 $\mu\text{g/l}$). O grupo de HPAs com maiores concentrações nas amostras foram os alquilados. Estes compostos, por sua vez, termodinamicamente instáveis e desaparecem durante a combustão, indicando uma origem petrogênica, com o lançamento direto de petróleo e seus derivados (exposição experimental direta ao diesel). Esses compostos tendem a se

associar ao material orgânico particulado na coluna d'água, sendo degradado rapidamente (Saha et al., 2009).

As concentrações de HPAs com 2-3 anéis foram maiores que os HPAs com 4-6 anéis, em todos os tratamentos experimentais, exceto no tratamento SWA. As características hidrofóbicas entre esses diferentes grupos de HPAs são influenciadas pelo tipo de amostra, por isso os HPAs de menor peso molecular (2-3 anéis), que apresentam uma menor hidrofobicidade, tendem a ser mais abundantes na coluna de água e estarão principalmente associados aos sólidos em suspensão. Os HPAs de alto peso molecular (4-6 anéis) apresentam maior hidrofobicidade e geralmente estão associados ao fundo, no sedimento (Luo et al., 2006). Os HPAs de menor massa molecular, além de apresentarem menor hidrofobicidade e maior disponibilidade em amostras de água, estão associados ao derramamento direto de petróleo e seus derivados, indicando exatamente a exposição direta pelo experimento, associados a fontes petrogênicas (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). Os HPAs com maior massa molecular, com mais de três anéis aromáticos, são comumente originados de fontes pirogênicas, como a combustão incompleta de material orgânico, além das emissões industriais e de veículos (Yunker et al., 2002).

4.2 Crescimento e mortalidade

Não houve diferença significativa no crescimento médio dos indivíduos que pudesse ser atribuído à exposição experimental ao óleo diesel e ao óleo diesel com remediador químico. No entanto os organismos do tratamento D+SWA não apresentaram crescimento entre os tempos de 10 e 30 dias, que após a esse intervalo de tempo, reestabeleceu seu crescimento. Os organismos expostos aos contaminantes tinham em média 18,1 mm, sendo considerados juvenis entrando para fase adulta (Boehs et al, 2008). Bivalves adultos têm a capacidade de detectar xenobióticos e fechar suas valvas para evitar a exposição de contaminantes (Van Hassel e Farris 2007), existindo uma dificuldade de obter respostas precisas em testes de toxicidade aguda em bivalves adultos (Cope et al., 2008). Devido a isso, testes crônicos e medidas subletais significativas de aptidão, como saúde fisiológica e sucesso reprodutivo podem elucidar de maneira mais eficiente os impactos em nível populacional (Cope et al., 2008). No entanto apesar das limitações das medidas de aptidão, este estudo conseguiu identificar

diferença entre o tamanho médio dos indivíduos durante a avaliação de 60 dias, porém a diferença no crescimento dos organismos não está relacionada à exposição experimental.

Apesar de não ocorrer uma diferença significativa no crescimento dos organismos, os indivíduos do tratamento SWA e D+SWA apresentaram uma mortalidade significativa entre os demais grupos, indicando uma possível toxicidade do remediador químico nas condições experimentais. Baxter et al, 2018 realizaram testes para avaliar a toxicidade do Accell Clean SWA, e obtiveram a concentração de 37 mg/L com mortalidade significativa em relação ao controle para larvas e organismos adultos de *Palaemonetes pugio*, o estudo também identificou uma mortalidade de 100% das larvas e adultos em 50% e 100% de uma fração acomodada quimicamente com 25g/l de óleo bruto e 2,5 g/l de Accell Clean SWA. DeLorenzo et al, 2017 em um teste de mesocosmo com óleo bruto e o remediador Accell Clean SWA[®] também obtiveram 100% de mortalidade para organismos da família Amphipoda e da classe Polychaeta após 14 dias de exposição. Com tudo, embora os remediadores químicos possam ser uma alternativa para a retirada do óleo e seus derivados em ambientes costeiros, muitos estudos ainda precisam ser aplicados com a finalidade de compreender a toxicidade desses agentes, que podem potencializar seus efeitos deletérios conforme o ciclo de vida e até mesmo as condições ambientais (Chen et al, 2019)

4.3 Parâmetros bioquímicos

Os tratamentos com os contaminantes apresentaram uma indução de defesas antioxidantes no tempo de 60 dias, indicando uma resposta tardia ao estresse oxidativo. Entretanto, nem todos os parâmetros bioquímicos apresentaram respostas à contaminação por diesel. A atividades de SOD e os níveis de GSH aumentaram significativamente no tratamento D em relação ao controle no tempo de 60 dias, além de ocorrer uma indução da atividade de GPx nos tratamentos C e SWA, quando comparados com os tratamentos com os contaminantes no tempo de 30 dias. Apesar do tratamento D+SWA apresentar maiores concentrações de HPAs na coluna d'água, e a atividade de SOD e os níveis de GSH serem relativamente elevados, esse tratamento não apresentou médias com diferença significativa em relação ao controle, indicando

que nem o remediador químico e nem maiores quantidades de HPAs intensificaram as defesas antioxidantes nas condições experimentais.

A SOD exerce a primeira linha de defesa contra danos oxidativos, liberando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio (O_2), aumentando assim a tolerância e a persistência de organismos em ambientes contaminados (Kappus, 1985; Livingstone, 2001). A indução da atividade da SOD pode estar relacionada ao aumento do nível de superóxidos, causados pelos contaminantes. Essa indução da atividade enzimática ocorre como uma defesa antioxidante. (Van der Oost et al., 2003; Lima et al., 2007; Lüchmann et al., 2011). Neste estudo, a atividade da SOD não apresentou indução significativa pelos contaminantes nos tempos de 48 h, 10, 30, 45 dias, tendo uma resposta tardia no tempo de 60 dias. A indução da SOD nos tratamentos com os contaminantes aponta que ocorreu uma resposta antioxidante devido à produção de superóxidos pelos organismos desses grupos, apresentando um efeito ao longo prazo, o que demonstra que exposições agudas podem apresentar respostas antioxidantes tardias.

Neste estudo, os maiores níveis de GSH estiveram associados aos tratamentos com a adição de diesel no tempo de 60 dias, também indicando efeito a longo prazo pela exposição aguda. A concentração celular basal de glutathiona pode ficar um estado reduzido pela atividade da GR ou pela síntese de GSH pela ação de duas enzimas. (Meister e Anderson 1983; Wu et al., 2004). A GSH também é considerada uns dos primeiros meios de defesa antioxidante, assim, sua síntese pode ser aumentada devido a uma adaptação do mecanismo para diminuir o estresse oxidativo (Zhang et al., 2003; Ying et al., 2007); no entanto, um estresse oxidativo grave pode suprimir os níveis de GSH devido à perda de adaptabilidade no mecanismos da sua síntese. (Zhang et al., 2003; Ying et al., 2007).

A atividade de GST não apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos com os contaminantes e os controles, o que é inesperado, uma vez que a GST está relacionada com a eliminação de contaminantes orgânicos, que representa a enzima da fase II envolvida na desintoxicação de contaminantes lipofílicos das células, como os HPAs (Van der Oost et al., 2003; Vidal-Linãn et al., 2014). Em um experimento de laboratório, Richardson et al. (2008) obtiveram poucas induções da atividade de GST em bivalves, sugerindo que a GST não responde imediatamente ao estresse oxidativo decorrente da exposição aguda (apenas 48 horas) por HPAs. Este fato

pode indicar que a exposição curta não foi o suficiente para ativar essa defesa antioxidante.

A GPx catalisa a transformação de H_2O_2 em moléculas água (H_2O) (Dussauze et al., 2015; Richardson et al., 2008). Essa enzima também é responsável pela remoção de hidroperóxidos e evita a formação de lipoperóxidos, auxiliando na prevenção de danos às membranas celulares (Oliva et al., 2010). Assim, é considerada uma enzima eficiente contra a peroxidação lipídica (Winston and Di Giulio, 1991). A GPx apresentou grandes variações durante todos os tempos, porém sua atividade teve uma indução significativa nos controles C e SWA no tempo de 30 dias, e logo voltou com oscilações em sua atividade, sem diferença entre os tratamentos. A produção de EROs tende a aumentar a atividade de GPx como uma defesa antioxidante (Catalano et al., 2012). No entanto, a resposta de GPx apresenta muitas variações quanto à sua atividade após a contaminação (Lüchmann et al., 2011; Marques et al., 2014; Nogueira et al., 2015), assim a indução inesperada da atividade nos organismos dos controles pode estar relacionado à variações fisiológicas sem ligação ao experimento. As oscilações entre os tratamentos e os baixos valores na atividade de GPx nos tratamentos contaminados por HPAs, principalmente no tempo de 30 dias, podem estar relacionadas a baixos níveis basais de GPx, que podem alterar a atividade enzimática (Oliveira et al., 2012)

A peroxidação lipídica (LPO) ocorre quando oxirradicais causam lesões, danos na membrana e ao DNA, e podem prejudicar a função celular normal (Davies, 2000; Livingstone, 2001). As membranas peroxidadas tornam-se rígidas, perdem permeabilidade seletiva, até perder sua integridade (Davies, 2000). A concentração de LPO, apesar de ser considerado um importante parâmetro do estresse oxidativo, não variou significativamente entre os tratamentos, apresentando apenas uma redução significativa no tempo de 45 dias. Os padrões observados podem estar relacionados a uma variabilidade natural e a fatores ambientais ou fisiológicos (Sandrini-Neto et al., 2016), que não estão relacionados à exposição aguda pela fração acomodada de óleo diesel, pelo fato de todos os grupos apresentarem variações semelhantes em seus níveis em todos os tempos. Zanete et al. (2015) identificou que temperaturas baixas podem aumentar os níveis de LPO, que pode ser justificado por uma diminuição das defesas antioxidantes ou relacionado a adaptações fisiológicas a baixas temperaturas (Zanete et al., 2015). A realização do experimento ocorreu entre o Outono e Inverno no hemisfério sul, o que pode ter conduzido níveis altos e alterados de LPO no período analisado.

Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo e dano celular demonstraram que as defesas antioxidantes foram ativadas nos tratamentos contaminados por diesel, sendo que a SOD e a GSH apresentaram alterações em sua atividade e em seus níveis respectivamente, no tempo de 60 dias, indicando que uma exposição aguda por HPAs pode ocasionar efeitos a longo prazo. Os resultados também demonstram que apesar do tratamento D+SWA apresentar quantidades superiores de HPAs na água em relação ao tratamento com apenas diesel, a atividade de SOD e os níveis de GSH não tiveram diferença significativa em relação ao controle. A atividade da GPx também apresentou alterações em relações aos tratamentos contaminados, como uma indução significativa da atividade nos tratamentos C e SWA no tempo de 30 dias, indicando que níveis basais baixos dessa enzima podem alterar essa defesa antioxidante. Esses resultados demonstraram que o organismo teste *Anomalocardia brasiliiana* nas condições experimentais apresentou uma ativação tardia das defesas antioxidantes, revelando que apesar da contaminação ocorrer em pequena escala de tempo (48 horas), o estresse oxidativo pode afetar o organismo a longo prazo.

5. Conclusão

O experimento com a exposição aguda à fração acomodada de óleo diesel para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo e dano celular, junto com as respostas de crescimento e mortalidade apresentaram efeitos tardios. Os resultados indicam que a exposição aguda aos contaminantes, não foi o suficiente para provocar menores taxas de crescimento dos organismos expostos aos tratamentos D e D+SWA, com tudo os níveis de mortalidade dos tratamentos SWA e D+SWA foram significativamente maiores que o C e D, indicando uma possível toxicidade do remediador químico Accell Clean SWA.

As defesas antioxidantes foram ativadas tardiamente com a indução da atividade da SOD e um aumento nos níveis de GSH no tratamento D, no tempo de 60 dias. Os tratamentos C e SWA apresentaram uma indução da atividade da GPx no tempo de 30 dias de exposição em relação aos tratamentos com os contaminantes, podendo estar relacionado a níveis basais dessa enzima. Apesar do remediador químico biodisponibilizar maiores concentrações de HPAs no tratamento D+SWA, as concentrações utilizadas nesse estudo junto com a exposição aguda, não foram suficientes para intensificar os efeitos da combinação do óleo diesel com o remediador

químico quando comparados ao tratamento com apenas diesel. No entanto, apesar do tratamento D+SWA não apresentar respostas significativas nos parâmetros bioquímicos, a mortalidade expressiva do SWA e D+SWA aponta uma toxicidade do remediador químico, indicando uma necessidade de mais estudos que avaliem os efeitos do remediador químico Accell Clean SWA[®] em áreas impactadas por petróleo e seus derivados.

Referências

- Abdel-Shafy, H.I., & Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123.
- Abreu-Mota, M.A., Moura Barboza, C.A., Bicego, M.C., Martins, C.C., 2014. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. *Chemosphere.* 103, 156–163.
- Anderson, J. W., Lee, R. F., 2006. Use of Biomarkers in Oil Spill Risk Assessment in the Marine Environment. *Hum. Ecol. Risk assessment: An International Journal*, 12, 1192–1222.
- Bacosa, H.P., Inoue, C., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *J. Hazard. Mater.* 283, 689–697.
- Barboza, C.A.M., Hadlich, H.L., Sandrini-Neto, L., Martins, C.C., Lana, P.C., 2013. Is the distribution of the lancelet *Branchiostoma caribaeum* affected by sewage discharges? An analysis at multiple scales of variability. *Mar. Pollut. Bull.* 69, 178–188.
- Baxter, S.E., Delorenzo, M.E., Beckingham, B., Fulton, M.H., 2018. Toxicity comparison of the shoreline cleaners Accell Clean ® and PES-51 ® in two life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 10926–10936.
- Boehs, G., Absher, T.M., Cruz-Kaled, A., 2008. Ecologia populacional de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *B. Inst. Pesca* 34, 259–270.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248–254.
- Cardoso, F.D., Dauner, A.L.L., Martins, C.C., 2016. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. *Environ. Pollut.* 214, 219–229.
- Catalano, B., Moltedo, G., Martuccio, G., Gastaldi, L., Virno-Lamberti, C., Lauria, A., Ausili, A., 2012. Can *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) be considered a good candidate in evaluating PAH contamination? A multimarker approach. *Chemosphere* 86, 875–882.
- Chen, B., Xuan, X., Zhu, L., Wang, J., Gao, Y., Yang, K., Shen, X., Lou, B., 2004. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters, sediments and soils of Hangzhou City, China. *Water Res.* 38, 3558–3568.
- Claireaux, G., Theron, M., Prineau, M., Dussauze, M., Merlin, F.X., Le Floch, S., 2013. Effects of oil exposure and dispersant use upon environmental adaptation performance and fitness in the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Toxicol.* 130–131, 160–170.
- CONAMA (Brazilian Council of Environment), 2014. Resolution no 463, from July, 29/2014. Provides for the environmental control of products intended for remediation. In: *Official Diary of the Union, Brasilia.* 85–86.
- Cope, W.G., Bringolf, R.B., Buchwalter, D.B., Newton, T.J., Ingersoll, C.G., Wang, N., Augspurger, T., Dwyer, F.J., Barnhart, M.C., Neves, R.J., Hammer, E., 2008. Differential exposure, duration, and sensitivity of unionoidean bivalve life stages to environmental contaminants. *J. North Am. Benthol. Soc.* 27, 451–462.
- Dauvin, J.C., Bellan, G., Bellan-Santini, D., 2010. Benthic indicators: From subjectivity

to objectivity - Where is the line? *Mar. Pollut. Bull.* 60, 947–953.

Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279–289.

DeLorenzo, M.E., Key, P.B., Wirth, E.F., Pennington, P.L., Chung, K.W., Pisarski, E., Shaddrix, B., Baxter, S., Fulton, M.H., 2017. Efficacy and ecotoxicological effects of shoreline cleaners in salt marsh ecosystems. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 232. pp.110.

Díaz-Jaramillo, M., Rocha, A.M., Chiang, G., Buchwalter, D., Monserrat, J.M., Barra, R., 2013. Biochemical and behavioral responses in the estuarine polychaete *Perinereis gualpensis* (Nereididae) after *in situ* exposure to polluted sediments. *Ecotox. Environ Saf.* 89, 182–188.

Dussauze, M., Danion, M., Le Floch, S., Lemaire, P., Pichavant-Rafini, K., Theron, M., 2015. Innate immunity and antioxidant systems in different tissues of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to crude oil dispersed mechanically or chemically with Corexit 9500. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120, 270–278.

Egres, A.G., Martins, C.C., Oliveira, V.M., Lana, P.C., 2012. Effects of an experimental *in situ* diesel oil spill on the benthic community of unvegetated tidal flats in a subtropical estuary (Paranaguá Bay, Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2681–2691.

Etkin, D.S., 2001. Methodologies for estimating shoreline cleanup costs, Proceedings of 24th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar, pp. 70

Fingas, M., 2012. The basics of oil spill cleanup, CRC press. New York, NY. pp 286.

Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280.

- Fonseca, A.L.D., Machado, E.C., Brandini, F.P., Brandini, N., 2013. Microphytobenthic biomass on a subtropical intertidal flat of and the influence of environmental conditions. *Bras. J. Oceanogr.* 61, 83-92.
- Franklin, C.L., Warner, L.J., 2011. Fighting chemical with chemicals: the role and regulation of dispersants in oil spill response. *Nat. Resour. Environ.* 26-47.
- Gil, F., Pla, A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21, 245–255.
- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X., 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectroch. Bioener.* 45, 41–45.
- Gong, Y., Zhao, X., Cai, Z., O'Reilly, S.E., Hao, X., Zhao, D., 2014. A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 16–33
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104, 580–587.
- Hemmer, M.J., Barron, M.G., Greene, R.M., 2011. Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (ISC), and chemically dispersed ISC to two aquatic test species. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2244–2252.
- Hyland, J., Balthis, L., Karakassi, I., Magni, P., Petrov, A., Shine, J., Vestergaard, O., Warwick, R., 2005. Organic carbon content of sediments as an indicator of stress in the marine benthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 295, 91-103.
- Jiang, Z.-Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.

- Kaloyianni, M., Dailianis, S., Chrisikopoulou, E., Zannou, A., Koutsogiannaki, S., Alamdari, D.H., Koliakos, G., Dimitriadis, V.K., 2009. Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* 149, 631–639.
- Kappus, H., 1987. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chem. Phys. Lipids* 45, 105–115.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Krauss, M., Wilcke, W., Martius, C., Bandeira, A.G., Garcia, M.V.B., Amelung, W., 2005. Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environ. Pollu.* 135, 143–154
- Lana, P.C., Marone, E., Lopes, R.M., Machado, E.C., 2001. The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brazil. In: Seeliger, U., Kjerfve, B. (Eds.), *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer, Berlin, pp. 131–145.
- Lawrence, M.A., 2016. ez: Easy Analysis and Visualization of Factorial Experiments. R package version 4.4-0. <https://CRAN.R-project.org/package=ez>
- Lee, K., Boufadel, M., Chen, B., Foght, J., Hodson, P., Swanson, S., Venosa, A., 2015. *The behaviour and environmental impacts of crude oil released into aqueous environments*, Ottawa: The Royal Society of Canada.
- Lenth, R. V., 2020. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.4. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lima, I., Moreira, S.M., Rendón-Von Osten, J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* 66, 1230–1242.

- Livingstone, 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lüchmann, K.H., Mattos, J.J., Siebert, M.N., Granucci, N., Dorrington, T.S., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Daura-Jorge, F.G., Bainy, A.C.D., 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquat. Toxicol.* 105, 652–660.
- Luo, X.-J., Chen, S.J., Mai, B.X., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., Fu, J.M., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. *Environ. Pollut.* 139, 9-20.
- Lyons, M.C., Wong, D.K.H., Mulder, I., Lee, K., Burridge, L.E., 2011. The influence of water temperature on induced liver EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to crude oil and oil dispersants. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 904–910
- Lytle, D.A., Peckarsky, B.L., 2001. Spatial and temporal impacts of a diesel fuel spill on stream invertebrates. *Freshw. Biol.* 46, 693–704.
- Marone, E., Machado, E.C., Lopes, R.M., Silva, E.T., 2005. Land–ocean fluxes in the Paranaguá Bay estuarine system, southern Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 53, 169–181.
- Marques, J.A., Silva de Assis, H.C., Guiloski, I.C., Sandrini-Neto, L., Carreira, R.S., Lana, P.C., 2014. Antioxidant defense responses in *Mytella guyanensis* (Lamarck 1819) exposed to an experimental diesel oil spill in Paranaguá Bay (Paraná, Brazil). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 269–275
- Martins, C.C., Bicego, M.C., Mahiques, M.M., Figueira, R.C.L., Tessler, M.G., Montone, R.C., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): Sources and depositional history. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 452–458.

- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711–760
- Michel, J., Rutherford, N., 2013. Oil spills in marshes: Planning and response considerations: NOAA/API. pp 77.
- Michel, J., Walker, A.H., Scholz, D., Boyd, J., 2001. Surface-washing agents: product evaluations, case histories, and guidelines for use in marine and freshwater habitats, International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute. pp. 805-813.
- Milinkovitch, T., Godefroy, J., Théron, M., Thomas-Guyon, H., 2011. Toxicity of dispersant application: Biomarkers responses in gills of juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Environ Pollut.* 159, 2921–2928.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Bianchini, A., 2003. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments. Toxicol.* 9, 255–269.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 221–234.
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Research* 63, 219–235.
- National Research Council, 2003. Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects. The National Academies Press, Washington, DC.
- Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, A.L.M., da Silva Acosta, D., Dafre, A.L., Oliveira, T.Y.K., de Almeida, E.A., 2015. Biochemical responses in mussels

Perna perna exposed to diesel B5. *Chemosphere*. 134, 210-216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.034>.

Ocon, C.S., Capítulo, A.R., Paggi, A.C., 2008. Evaluation of zoobenthic assemblages and recovery following petroleum spill in a coastal area of Río de la Plata estuarine system, South America. *Environ Pollut.* 156, 82–89. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.035

Oliva, M., González de Canales, M.L., Gravato, C., Guilhermino, L., Perales, J.A., 2010. Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1842–1851.

Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Sci. Total Environ.* 396, 70–78.

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. R Core Team. 2019. `nlme`: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-142. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>

R Core Team. 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org/>)

Reis-Henriques, M.A., Ferreira, M., Coimbra, A.M., D’Silva, C., Costa, J., Shailaja, M.S., 2009. Phenanthrene and nitrite effects on juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*, using hepatic biotransformation enzymes, biliary fluorescence, and micronuclei as biomarkers. *Cienc. Mar.* 35, 29–40

Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels integrate biomarker responses? *Mar. Pollut. Bull.* 57, 503–514.

- Saha, M., Togo, A., Mizukawa, K., Murakami, M., Takada, H., Zakaria, M.P., et al., 2009. Sources of sedimentary PAHs in tropical Asian waters: differentiation between pyrogenic and petrogenic sources by alkyl homolog abundance. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 189-200.
- Sandrini-Neto, L., Camargo, M.G., 2012. GAD: an R package for ANOVA designs from general principles. R package version 1.1.1. <http://CRAN.Rproject.org/package=GAD>.
- Sandrini-Neto, L., Pereira, L., Martins, C.C., Silva de Assis, H.C., Camus, L., Lana, P.C., 2016. Antioxidant responses in estuarine invertebrates exposed to repeated oil spills: effects of frequency and dosage in a field manipulative experiment. *Aquat. Toxicol.* 177, 237–249.
- Sarà, G., Pusceddu, A., 2008. Scope for growth of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk 1819) in oligotrophic coastal waters (Southern Tyrrhenian Sea, Italy). *Mar. Biology* 156, 117–126
- Seabra, C.D., Abessa, D.M.S., Choueri, R.B., Almagro-pastor, V., Cesar, A., Maranhão, L.A., Martín-díaz, M.L., Torres, R.J., Gusso-choueri, P.K., Almeida, J.E., Cortez, F.S., Mozeto, A.A., Silbiger, H.L.N., Sousa, E.C.P.M., Angel, T., Valls, D., Bainy, A.C.D., 2014. Ecological relevance of sentinels ' biomarker responses : A multi-level approach. *Mar. Environ. Res.* 96, 118–126.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.
- Sobral, P., Widdows, J., 2000. Effects of increasing current velocity, turbidity and particle size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 245, 111–125.

- Solé, M., Kopecka-Pilarczyk, J., Blasco, J., 2009. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environ. Int.* 35, 523–531.
- Souza, F.M., Brauko, K.M., Lana, P.C., Muniz, P., Camargo, M.G., 2013. The effect of urban sewage on benthic macrofauna: a multiple spatial scale approach. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 234–240. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.021
- Stevens, T., Boden, A., Arthur, J.M., Schlacher, T.A., Rissik, T., 2012. Atkinson S. Initial effects of a moderate-sized oil spill on benthic assemblage structure of a subtropical rocky shore. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 109, 107–115.
- Turja, R., Soirinsuo, A., Budzinski, H., Devier, M.H., Lehtonen, K.K., 2013. Biomarker responses and accumulation of hazardous substances in mussels (*Mytilus trossulus*) transplanted along a pollution gradient close to an oil terminal in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Comp. Biochem. Physiol.* 157, 80–92.
- UNEP, (United Environment Programme), 1992. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments, reference methods for marine pollution studies. No. 20, UNEP, Nairobi, Kenya, pp.75.
- USA., 2001. United States Environmental Protection Agency, Office of Environmental Information, Emergency Planning and Community Right-to Know Act – Section 313: Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category, EPA 260-B- 01-03,. Washington, DC.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Van Hassel, J. H., Farris, J. L., 2007. A review of the use of unionid mussels as biological indicators of ecosystem health. *Fresh. Biv. Ecotox.* 2, 19–49.

- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., 2013. Practical procedures for selected biomarkers in mussels *Mytilus galloprovincialis* — Implications for marine pollution monitoring. *Sci. Total Environ.* 461–462, 56–64.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Etxebarria, N., Nieto, O., Beiras, R., 2014. Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas. *Sci. Total Environ.* 470–471, 107–116.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York. pp. 211.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D., 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* 134, 489–492.
- Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 288–293
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33, 489-515.
- Zanette, J., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2015. Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: Pollution and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.* 103, 74–79.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature.* 490, 49–54.

Zhang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2003. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 110–116.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. *Statistics for Biology and Health*. pp. 580.

RESULTADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1: Concentrações ($\mu\text{g/l}$) dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários (HPAs) e Alquilados homólogos na água dos tratamentos experimentais.

Compostos	Controle	SWA	D	D + SWA
Naftaleno	0,17	0,29	0,21	0,40
Acenaftileno	0,03	0,04	0,04	0,13
Acenafteno	n.d.	0,01	0,06	0,50
Fluoreno	0,04	0,07	0,16	1,57
Fenantreno	0,04	0,07	0,23	1,73
Antraceno	0,01	0,02	0,05	0,19
Fluoranteno	n.d.	0,15	0,04	0,07
Pireno	n.d.	0,41	0,08	0,43
Benzo(a)antraceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Criseno	n.d.	0,02	n.d.	0,11
Benzo(b)fluoranteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(k)fluoranteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(e)pireno	n.d.	0,02	n.d.	0,08
Benzo(a)pireno	n.d.	0,02	n.d.	0,02
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dibenzo(a,h)antraceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(g,h,i)perileno	n.d.	0,02	n.d.	0,04
$\Sigma\text{-C}_1\text{- naftaleno}$	0,05	0,11	0,48	1,68
$\Sigma\text{-C}_2\text{- naftaleno}$	0,03	0,06	0,56	4,14
$\Sigma\text{-C}_3\text{- naftaleno}$	0,02	0,04	0,52	4,72
$\Sigma\text{-C}_1\text{- fenantreno}$	n.d.	0,01	0,15	1,26

Tabela S2: Quantidade de indivíduos mortos durante os 60 dias de experimento. Cada tratamento tinham 150 indivíduos.

48h	10 D	30 D	45 D	60 D	TOTAL
------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------

C	0	0	0	0	0	0
SWA	6	2	5	1	0	14
D	0	0	3	1	1	5
D+SWA	4	2	2	1	2	11

Tabela S3: Valores médios por réplica do crescimento das conchas em (mm) dos 30 indivíduos de cada tratamento: Controle (C), Controle com remediador químico (SWA), Diesel (D), Diesel com remediador químico (D+SWA), nos tempos 10 d, 30 d, 45 d, 60 d após a exposição.

Tempo	Tratamento	Réplica	mm
10d	Controle	R1	18,32
10d	Controle	R2	18,11
10d	Controle	R3	18,19
10d	SWA	R1	18,16
10d	SWA	R2	18,24
10d	SWA	R3	18,53
10d	Diesel	R1	17,86
10d	Diesel	R2	17,92
10d	Diesel	R3	18,34
10d	Diesel+SWA	R1	17,88
10d	Diesel+SWA	R2	17,94
10d	Diesel+SWA	R3	18,14
30d	Controle	R1	18,32
30d	Controle	R2	18,16
30d	Controle	R3	18,36
30d	SWA	R1	18,14
30d	SWA	R2	18,54
30d	SWA	R3	18,53
30d	Diesel	R1	17,97
30d	Diesel	R2	18,05
30d	Diesel	R3	18,46
30d	Diesel+SWA	R1	17,88
30d	Diesel+SWA	R2	17,94

30d	Diesel+SWA	R3	18,14
45d	Controle	R1	18,44
45d	Controle	R2	18,15
45d	Controle	R3	18,57
45d	SWA	R1	18,18
45d	SWA	R2	18,71
45d	SWA	R3	18,48
45d	Diesel	R1	17,96
45d	Diesel	R2	18,46
45d	Diesel	R3	18,60
45d	Diesel+SWA	R1	18,04
45d	Diesel+SWA	R2	18,08
45d	Diesel+SWA	R3	18,25
60d	Controle	R1	18,50
60d	Controle	R2	18,13
60d	Controle	R3	18,66
60d	SWA	R1	18,32
60d	SWA	R2	18,74
60d	SWA	R3	18,47
60d	Diesel	R1	18,07
60d	Diesel	R2	18,51
60d	Diesel	R3	18,69
60d	Diesel+SWA	R1	18,07
60d	Diesel+SWA	R2	18,27
60d	Diesel+SWA	R3	18,25

Tabela S4: Valores brutos da atividade de superóxido dismutase (SOD), glutatona-S-transferase (GST) e glutatona peroxidase (GPx), e os valores brutos dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO).

Tempo	Tratamento	Replica	SOD	GST	GPx	GSH	LPO
48h	Controle	R1	577,289	262,1258	191,4138	0,2303	15,9917
48h	Controle	R2	309,662	238,3067	7,7783	1,6087	18,5328
48h	Controle	R3	253,122	237,0783	37,3829	1,6512	1,7719
48h	SWA	R1	362,254	276,2407	25,4539	3,0955	11,4876
48h	SWA	R2	228,204	184,4921	14,6928	1,0636	3,2093
48h	SWA	R3	407,603	313,3436	45,4626	2,8998	16,5454
48h	Diesel	R1	304,966	270,2455	35,3867	3,1355	1,4825
48h	Diesel	R2	291,483	319,1708	183,6748	1,7487	9,8654
48h	Diesel	R3	292,298	284,3038	200,0764	2,2259	8,1444
48h	Diesel+SWA	R1	528,602	366,2875	11,4208	4,9604	4,9804
48h	Diesel+SWA	R2	364,368	285,8998	13,1149	3,2436	3,478
48h	Diesel+SWA	R3	383,817	228,34	6,7342	2,2749	11,5594
10d	Control	R1	283,094	247,1402	39,5211	5,8257	0,7969
10d	Control	R2	369,05	257,9455	53,4872	3,6958	13,4738
10d	Control	R3	238,962	205,353	238,7205	3,1884	6,9573
10d	SWA	R1	278,529	313,75	297,1499	3,6865	4,3389
10d	SWA	R2	396,883	301,6223	0,6475	4,3119	3,8165
10d	SWA	R3	307,897	242,2075	6,2565	3,1884	8,9053
10d	Diesel	R1	312,823	203,4896	12,684	3,9601	4,8821
10d	Diesel	R2	314,433	291,7834	3,0265	2,0331	6,7244
10d	Diesel	R3	270,515	252,4577	14,4872	3,4957	0,3493
10d	Diesel+SWA	R1	223,321	207,1474	51,1066	3,384	2,851
10d	Diesel+SWA	R2	190,657	233,8353	176,8784	2,328	1,6799
10d	Diesel+SWA	R3	680,872	286,4797	228,4658	4,9368	3,4856
30d	Controle	R1	592,06	259,2156	80,406	1,6815	4,2969
30d	Controle	R2	526,596	241,7992	123,3465	0,7594	6,7694
30d	Controle	R3	855,949	258,8372	146,1399	0,5174	9,1942
30d	SWA	R1	710,481	225,3474	190,5694	1,7374	2,5075

30d	SWA	R2	901,787	292,8573	168,8038	2,6856	0,2907
30d	SWA	R3	840,396	288,0269	158,5631	1,6397	1,2287
30d	Diesel	R1	816,78	285,3342	108,3659	0,767	9,753
30d	Diesel	R2	693,802	302,107	16,8569	1,8827	3,5705
30d	Diesel	R3	606,217	130,911	10,1025	0,6309	1,1175
30d	Diesel+SWA	R1	972,731	250,5875	1,8943	1,4627	4,5213
30d	Diesel+SWA	R2	374,161	271,855	0,631	2,85	2,9571
30d	Diesel+SWA	R3	290,114	177,2025	1,8274	1,7637	2,7461
<hr/>							
45d	Controle	R1	447,832	336,7258	274,538	3,1332	3,1081
45d	Controle	R2	463,903	305,4	24,1146	1,5156	1,2979
45d	Controle	R3	294,052	264,4427	43,7252	0,5727	1,5259
45d	SWA	R1	396,886	304,3936	14,9834	0,06	2,8784
45d	SWA	R2	280,805	193,3555	2,9259	0,5279	0,4057
45d	SWA	R3	307,778	208,9933	12,156	0,9363	1,1304
45d	Diesel	R1	212,921	171,9924	3,0298	1,1261	1,5683
45d	Diesel	R2	461,88	239,1502	7,7861	1,1206	1,7261
45d	Diesel	R3	330,586	292,7085	117,2996	0,6081	1,4684
45d	Diesel+SWA	R1	287,965	238,0531	34,0892	1,1206	1,6561
45d	Diesel+SWA	R2	624,401	292,2375	49,7489	0,2345	17,1797
45d	Diesel+SWA	R3	350,677	338,4244	15,4144	3,4444	3,4414
<hr/>							
60d	Controle	R1	408,276	183,1719	6,5699	2,6371	13,1112
60d	Controle	R2	342,062	166,9715	4,343	2,6921	1,4619
60d	Controle	R3	357,624	269,7223	17,084	2,5149	0,8974
60d	SWA	R1	476,523	226,4508	122,9517	1,9998	1,8047
60d	SWA	R2	301,228	267,0605	137,149	1,9973	4,1128
60d	SWA	R3	399,578	347,2718	12,8076	1,8974	4,3287
60d	Diesel	R1	573,159	263,1835	9,7793	6,0986	13,6263
60d	Diesel	R2	594,137	338,8939	0	3,1676	2,7033
60d	Diesel	R3	1175,551	301,2098	14,7001	7,3439	5,1696

60d	Diesel+SWA	R1	831,782	327,8441	6,2344	4,3572	3,8093
60d	Diesel+SWA	R2	733,365	314,4124	21,4691	4,7939	4,4594
60d	Diesel+SWA	R3	349,432	164,6022	215,0153	1,8476	1,2664
