

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Instituto de Oceanografia

Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica

**PROBLEMÁTICA RELACIONADA COM A
OCORRÊNCIA AMBIENTAL DE PARTÍCULAS DE
TINTAS ANTI-INCRUSTANTES NO ESTUÁRIO DA
LAGOA DOS PATOS, RS, BRASIL.**

SANYE SOROLDONI GUIMARÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: *Prof. Dra.* GRASIELA LOPES LEÃES PINHO
Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.

Co-orientador: *Prof. Dr.* ÍTALO BRAGA CASTRO
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil.

Rio Grande, RS, Brasil

Maio, 2017.

**PROBLEMÁTICA RELACIONADA COM A
OCORRÊNCIA AMBIENTAL DE PARTÍCULAS DE
TINTAS ANTI-INCRUSTANTES NO ESTUÁRIO DA
LAGOA DOS PATOS, RS, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física,
Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de
Doutor

por

SANYE SOROLDONI GUIMARÃES

Rio Grande, RS, Brasil

Maio, 2017.

© A cópia parcial e a citação de trechos desta tese são permitidas sobre a condição de que qualquer pessoa que a consulte reconheça os direitos autorais do autor. Nenhuma informação derivada direta ou indiretamente desta obra deve ser publicada sem o consentimento prévio e por escrito do autor.

GUIMARÃES, SANYE SOROLDONI

Problemática relacionada com a ocorrência ambiental de partículas de tintas anti-incrustantes no estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Sanye Soroldoni Guimarães. - Rio Grande: FURG, 2017. 152 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande. Doutorado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Área de Concentração: Oceanografia Química

1. Partículas de tintas anti-incrustantes. 2. Biocidas. 3. Estaleiros. I. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais
Pois são os maiores incentivadores
das minhas conquistas.

“ Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.” (Isaac Newton)



Agradecimentos

À Deus por sempre estar ao meu lado me mantendo firme nos meus objetivos, nunca deixando que eu perdesse a fé e a esperança na conquista desse sonho;

À Prof^a. Grasiela Lopes Leães Pinho pela orientação e amizade. Por aceitar me orientar e confiar no meu trabalho. Pelo apoio e pelas palavras de incentivo e compreensão sempre que necessárias;

Ao Prof. Ítalo Braga de Castro por todo o apoio e amizade. Por me receber tão bem no laboratório e pelos ensinamentos passados. Agradeço também a confiança no meu trabalho e o entusiasmo de seguirmos nos planos e projetos para o futuro;

Ao Prof. Gilberto Fillmann pela disponibilização do laboratório, apoio à realização desse projeto, por sempre sanar minhas dúvidas e contribuir constantemente na evolução da minha tese;

À Prof. Samantha Martins pelo auxílio com as análises de metais, pelas discussões, disponibilidade em participar da minha banca e pela valiosa contribuição dada ao trabalho;

Ao Prof. Osmar Moller por sempre estar disponível em nos receber e discutir o projeto, pela disponibilidade em participar da banca de defesa, pelo auxílio no embarque na lancha Larus e cooperação na realização desse trabalho.

Ao Prof. Rodrigo Choueri pela disponibilidade em participar da banca de defesa;

Aos Prof. Camila Martins e Fábio Andrei Duarte pelo auxílio nas análises de metais e pelas grandes contribuições ao trabalho;

Aos professores do PPGOFQG por todo o ensinamento passado e valiosa contribuição na minha formação dentro da Oceanografia.

Aos queridos amigos que fiz no laboratório CONECO, Ana Paula Santos, Ana Paula Carvalho, Andressa, Bárbara, Cesar, Fiamma, Isadora, Julia, Juliana, Juliane, Juliê, Leonardo, Luydia, Marcio, Martina, Michelle, Natália, Nilson, Ozelito, Patrícia, Rodrigo, Samantha e Vanda. Obrigada pelas palavras diárias de apoio e carinho, pela paciência e aprendizado no laboratório, pelas

festinhas, cafés da tarde, chocolates, etc. Com vocês foi possível seguir esse desafio com bom humor e tranquilidade!

Às alunas de graduação que me auxiliaram diretamente na manutenção do cultivo e nos testes de toxicidade, Ana Paula, Andressa e Samantha. Obrigada pelo apoio, com certeza aprendemos muito juntas;

Aos técnicos do CEME-SUL pelo auxílio nas análises de microscopia sempre que necessário;

Ao Prof^o Ednei Primel e a Dra. Sergiane Caldas do laboratório LACOM pelo auxílio e disponibilização do LC para as análises químicas;

Aos colegas, técnicos e professores da Hidroquímica e do LFC. A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desse trabalho. Em especial a Dra. Luiza Dy Costa pela ajuda com o contato dos estaleiros e dúvidas sanadas em relação às tintas;

Aos responsáveis do Yacht Club Rio Grande, Estaleiro Santos, Estaleiro Irmãos Fernandes, Estaleiro Quatro Irmãos e Estaleiros do Alemão por permitirem a entrada e acesso aos locais de amostragem e por nos fornecer as tintas. Aos pescadores das colônias da Barra, Bosque, Ilha dos Marinheiros e Torotama pela atenção dispensada nas entrevistas realizadas;

À FURG pela possibilidade de realização do meu doutoramento e às agências de fomento CAPES, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro para realização desse projeto;

Ao meu amor, Johnnyvan, pelo apoio incondicional nessa trajetória. Por sempre acreditar no meu potencial, entender meus momentos de distanciamento e me acompanhar nos congressos. Essa conquista também é sua! Te amo!

Aos meus sogros, Josevan e Graça, por todo o apoio que me foi dado durante meu curso. Pelo amor de pais que sempre recebi de vocês.

Aos meus pais, Jorge e Sonia, e meus irmãos Afonso, Thamyres e Angelo. Por entenderem a minha distância para realização desse sonho e por todo o apoio e incentivo que sempre recebi.

Índice

Agradecimentos	vi
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xi
Lista de Acrônimos, Abreviações e Símbolos	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
Capítulo I: Introdução	16
Capítulo II: Hipótese	22
Capítulo III: Objetivos	23
Capítulo IV: Área de estudo	24
Capítulo V: Material e Métodos	26
1. Identificação das áreas fontes de partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs).....	26
2. Amostragem.....	26
2.1. Amostragem de sedimento.....	26
2.2. Amostragem de PTAs	27
3. Triagem das PTAs no sedimento.....	27
4. Caracterização das PTAs.....	28
4.1. Análise qualitativa da composição elementar das PTAs no sedimento.....	28
4.2. Análise dos compostos metálicos nas PTAs dos estaleiros.....	28
4.3. Análise dos compostos orgânicos.....	29
4.4. Tempo de deposição das PTAs.....	30

5. Ensaio de toxicidade com sedimento.....	30
5.1. Fortificação.....	30
5.2. Preparo do elutriato dos sedimentos fortificados.....	31
5.3. Ensaio de toxicidade com os organismos <i>Hyalella azteca</i> e <i>Monokalliapseudes schubarti</i>	32
5.3.1. <i>H. azteca</i>	32
5.3.2. <i>M. schubarti</i>	33
5.4. Ensaio de toxicidade com o organismo <i>Nitokra sp.</i>	35
5.4.1. Ensaio de toxicidade crônica no sedimento integral.....	35
5.4.2. Ensaio de toxicidade aguda com o elutriato do sedimento.....	35
6. Ensaio com o lixiviado das PTAs.....	36
6.1. Preparo do lixiviado.....	36
6.2. Ensaio de toxicidade aguda com o organismo <i>Acartia tonsa</i>	37
6.3. Ensaio com a adição de quelantes.....	37
7. Análises dos químicos nos meios de exposição.....	38
7.1. Análise de compostos metálicos nas amostras aquosas.....	38
8. Análise dos dados.....	39
Capítulo VI: Artigos científicos.....	40
1. Antifouling paint particles: comparing sources, confirming environmental presence, describing dynamics and chemical composition.....	42
2. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?.....	76
3. Influência da interação organismo-sedimento na toxicidade das partículas de tintas anti-incrustantes.....	95

4. Potential toxicity of metals leached from antifouling paint particles under different salinities.....	126
Capítulo VII: Síntese da discussão e conclusões.....	143
Capítulo VIII: Referências Bibliográficas.....	148

Lista de Figuras/Lista de Tabelas

Figura 1: Área de estudo; (A) Visão ampla da LP, localizada no extremo Sul do Brasil conectada com o Oceano Atlântico; (B) Limites da área estuarina compreendida entre os molhes da Barra e a Ponta da Feitoria. Destaque para as cidades de Pelotas (PEL), Rio Grande (RG) e São José do Norte (SJN), as margens do estuário. Figura retirada de Àvila (2012).....25

Artigo 1

Table 1. Sites identified as potential source of APPs within Patos Lagoon (PL) estuary with their respective associated activities, antifouling paint trademarks used, methods used to remove antifouling coatings, maintenance frequency, boat size and disposal of generated APPs.....68

Table 2. Concentration of metals (mg kg^{-1}) and booster biocides (ng g^{-1}) in sediments samples. Results were expressed as mean \pm standard deviation. Samples 1 to 9 are from navigation channel and A to I from source areas (Fig.1)69

Table 3. Concentration of metals (kg g^{-1}) and booster biocides (ng g^{-1}) in APPs from boats samples collected in two different boat maintenance facilities (Table 1), site C – Santos shipyard and site G - YCRG. Results are expressed as mean \pm standard deviation.....71

Table 4. Relative percentage from EDS analyses of elements present in APPs collect from boats in two different boat maintenance facilities (Table 1), site C – Santos shipyard and site G - YCRG.....72

Table 5. Relative percentage of elements present in APPs obtained from sediments collected nearby five shipyards (B – Barra São José do Norte shipyard; C - Santos shipyard; D - Alemão shipyard; E - 4 Irmãos shipyard; F – Irmãos Fernandes shipyard, and G - Rio Grande Yacht Club) located at PL estuary.....73

Figure 1. Sources (A) and occurrence of antifouling paint particles in sediments (B). The numbers 1 to 9 indicate the sediment samples collected along the estuarine channel.....74

Figure 2. Settling speed experiment with APPs T1, T2 T3 and T4 of different sizes and without and under agitation. The y-axis represents the median position of APPs in the cylinder.....75

Artigo 2

Figure 1: Concentrations ($n=3$) of Cr (A), Mn (B), Ni (C), Pb (D), Cu (E) and Zn (F) in sediments spiked with antifouling paint particles used in bioassays. Different lowercase letters indicate significant differences between the treatments. Error bars denote standard deviation.....93

Figure 2: *Nitokra sp.* fecundity in whole sediment spiked with APPs (A) and (B) adult survival in elutriate of spiked sediment with APPs. Different lowercase letters indicate significant difference between the treatments. Error bars denote standard deviation.....93

Table 1: Levels of metals and organic booster biocides in APPs reported by different studies. N.a = Not analyzed; N.d = Not detected. The values were expressed in mean \pm standard deviation or minimum ~ maximum concentrations.....94

Artigo 3

Tabela 1: Concentrações dos metais nas PTAs utilizadas no experimento e no sedimento de exposição. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão (mg kg^{-1}). As letras subscritas diferentes indicam diferença significativa obtidas através do teste One-Way ANOVA ($p < 0,05$) na concentração do metal entre os tratamentos.....122

Tabela 2: Sobrevivência de *Monokalliapseues schubarti* e *Hyaella azteca* nos testes de toxicidade aguda com sedimento integral ($n = 50$) e elutriado do sedimento ($n = 40$). Valores expressos como porcentagem média \pm desvio padrão.....123

Figura 1: Concentração dos metais Mn, Zn e Cu na solução do elutriado das diferentes porcentagem de PTAs no sedimento. As letras diferentes indicam diferenças significativas dos metais entre os tratamentos.....124

Figura 2: Comparação entre as taxas de sobrevivência dos organismos *Monokalliapseudes schubarti* (quadrados) e *Hyaella azteca* (círculos) nos testes usando sedimento integral (A) e elutriado do sedimento (B). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre a sobrevivência dos organismos na mesma concentração (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$).125

Artigo 4

Figure 1: Survival of *Acartia tonsa* exposed LC_{50} of leachate in each salinity with and without addition of complexing agents (CA). Data are expressed as mean and standard deviation of *A. tonsa* survival ($n=40$). Asterisks (*) indicate significant difference between treatments in each salinity ($p < 0.001$)139

Figure 2: Metal concentration at 48h – LC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) to the euryhaline copepod *Acartia tonsa* in a wide range of salinities: 5 (solid circles), 15 (open circles) and 30 (open squares). Data are expressed as mean and standard deviation. Different lowercase letters indicate different 48h- LC_{50} values between salinities for the same metal. Different capital letters indicate different 48h- LC_{50} values between metals for the same salinity.....139

Figure 3: Concentration of Cu (A) and Zn (B) in each % of leachate dilution under three different salinities: 5 (circles), 15 (squares) and 3 (triangle). The different symbols indicate statistical difference between salinities in the same % of leachate solution (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).....140

Table 1: Mortality and calculated LC_{50} of *Acartia tonsa* exposed in different dilution of APPs leachate. Values were expressed as total number of organisms used in experiments.....141

Table 2: Physicochemical characteristics of artificial salt water used in the experiments.....142

Lista de Acrônimos e Abreviações

A

AFS – Sistema anti-incrustante (do inglês: *Antifouling systems*)

C

CEUA – Comitê de ética em uso animal

CL₅₀ – Concentração letal capaz de matar 50% dos organismos expostos

CONECO – Laboratório de microcontaminantes orgânicos e ecotoxicologia aquática

D

DSS – Dodecil Sulfato de Sódio

E

EFS – Extração em fase sólida

F

FURG – Universidade Federal de Rio Grande

I

ICP - OES – Espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively coupled plasma - Atomic emission spectrometry*)

L

LC - MS – Cromatografia de fase líquida com detector de espectrometria de massas (do inglês *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry*)

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LP – Lagoa dos Patos

M

MEV - EDS – Microscopia eletrônica de varredura acoplada a sonda de raio X

O

OMI – Organização Marítima Internacional

P

PTAs – Partículas de tintas anti-incrustantes

T

TAIs – Tintas anti-incrustantes

TBT - Tributilestanho

Resumo

As partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) são resíduos gerados durante a manutenção de embarcações em áreas localizadas principalmente às margens de estuários navegáveis. O presente trabalho teve como objetivo apresentar um panorama inédito da problemática relacionada à ocorrência ambiental e toxicidade das PTAs no estuário da Lagoa dos Patos (LP). Inicialmente, a investigação sobre as fontes potenciais no entorno do estuário da LP mostrou que dez áreas são geradoras de PTAs, dentre elas uma marina, estaleiros e portos pesqueiros. Testes de laboratório mostraram que as PTAs nos três diferentes compartimentos ambientais – sedimento integral, elutriado do sedimento e coluna d'água - causam toxicidade crônica bem como toxicidade aguda para organismos bentônicos estuarinos de diferentes faixas de sensibilidade. Essa alta toxicidade foi relacionada com as concentrações elevadas dos metais Cu e Zn, bem como dos compostos co-biocidas Diuron, Irgarol 1051 e DCOIT ainda presentes e liberados pelas PTAs. Adicionalmente, a toxicidade das PTAs foi influenciada pelo tipo de interação dos organismos bentônicos com o sedimento bem como pela variação de salinidade do compartimento ambiental avaliado. Esse cenário mostra-se ainda mais preocupante, uma vez que as PTAs atuam como uma fonte contínua e localizada de substâncias químicas perigosas. Portanto, a análise integrada dos resultados aqui apresentados indica que áreas de manutenção de embarcações são fontes potenciais de PTAs, estando os níveis encontrados nos sedimentos na mesma faixa das concentrações que causam efeito. Além disso, esses resíduos têm sido até o momento negligenciados devido à falta de legislação pertinente nas zonas costeiras Sul-americanas, representando um risco para os organismos estuarinos. Por fim, os resultados apresentados nessa tese são um primeiro esforço para que uma avaliação de risco relacionada à presença desse resíduo nos ambientes costeiros sul-americanos, seja realizada.

Palavras-Chave: Partículas de tintas anti-incrustantes, Estuário da Lagoa dos Patos, Biocidas, Metais, Tintas anti-incrustantes, Estaleiros, Portos pesqueiros, Organismos bentônicos, Mistura Cu-Zn

Abstract

Antifouling paints particles (APPs) are waste generated during vessel maintenance in areas located under the influence of navigable estuaries. The present study aimed to present an unprecedented overview related to environmental occurrence and toxicity of PTAs in the Patos Lagoon estuary (PL). Initially, ten potential sources of APPs around the LP estuary were identified and located in a marina, shipyards and fishing ports. Laboratory tests shown that APPs cause chronic and acute toxicity over estuarine benthic organisms of different sensitivity ranges, even in different environmental compartments - integral sediment, sediment elutriate and water column. This high toxicity was related to the high concentrations of Cu and Zn metals as well as the co-biocidal compounds Diuron, Irgarol 1051 and DCOIT still present and released from the APPs. Additionally, the toxicity of PTAs was influenced by the type of interaction of benthic organisms with sediment layers and by the salinity variation of the environmental compartment evaluated. This scenario is even more worrying, since APPs act as a continuous and localized source of hazardous chemicals. Therefore, the integrated analysis of the presented results indicates that, areas where is performed vessel maintenance are potential sources of APPs being the levels detected in sediments in the same range of concentrations that produce deleterious effects. In addition, considering that APPs are a neglected residue the lack of relevant legislation in the South American coastal zones represent a risk to estuarine organisms. Finally, the results presented in this thesis are a first effort to make a risk assessment related to the presence of this residue in South American coastal environments.

Keywords: Antifouling paint particles, Patos Lagoon estuary, Booster biocides, Metals, Antifouling paint, Boat/Shipyard, Fishery harbours, Benthic organisms, Cu-Zn mixture.

Capítulo I: Introdução

Os estuários estão entre os ecossistemas mais ameaçados pelos impactos decorrentes das atividades antrópicas, visto que adensamentos urbanos, áreas industriais e portuárias são frequentemente instalados as margens dessas regiões (Kennish, 1991). Dentre essas áreas, as zonas portuárias se destacam pelos aportes de inúmeros poluentes em concentrações que podem afetar os organismos aquáticos (Zagatto, 2008). Nesse sentido, o uso das tintas anti-incrustantes (TAIs) em embarcações, e a consequente liberação dos compostos biocidas presentes em sua composição, atuam como um fator impactante para os sistemas aquáticos, devido ao seu uso difundido nas regiões costeiras (Almeida et al., 2007).

As TAIs foram desenvolvidas para evitar a bioincrustação marinha, que consiste no estabelecimento de uma comunidade de organismos que aderem e crescem na superfície externa de estruturas, tanto naturais quanto antrópicas, submersas na água do mar (Yebra et al., 2004). No caso das embarcações, a bioincrustação pode trazer efeitos adversos, tais como: (i) aumento da fricção devido à rugosidade gerada, que leva a uma diminuição da velocidade e menor rendimento da potência dos motores (Yebra et al., 2004). Esse processo leva ao aumento no consumo de combustíveis e consequentemente das emissões de gases danosos (Champ, 2003); (ii) Aumento na frequência entre docagens para retirada dos organismos, limpeza da embarcação e nova pintura, elevando os custos e gerando grande quantidade de resíduos (Abbott et al., 2000); (iii) introdução de espécies exóticas (Yebra et al., 2004).

Muitas substâncias foram utilizadas como princípio ativo nas TAIs ao longo do tempo, sendo que em meados do século XX, os óxidos de cobre e zinco foram os primeiros biocidas utilizados (Godoi et al., 2003). No entanto, a sua durabilidade era de 1 ano. Além disso, algumas espécies de algas mostraram ser resistentes ao cobre, diminuindo a eficiência dessas

tintas (Almeida et al., 2007). Como consequência dessa rápida perda de eficiência, as primeiras tintas à base de substâncias organometálicas (com estanho, mercúrio, arsênio, dentre outros) apareceram por volta de 1950 e impulsionaram o aparecimento, em 1961, das TAIs a base de Tributilestanho (TBT). Estas últimas, ganharam reconhecimento por sua alta durabilidade e eficiência (Almeida et al., 2007; Yebra et al., 2004). Na década de 80, tintas a base de TBT chegaram a revestir 90% dos cascos de embarcações em operação no mundo, aumentando o período entre as docagens em até 7 anos o que diminuiu, significativamente, os custos com a manutenção das embarcações (Almeida et al., 2007; Castro et al., 2011). Apesar da alta durabilidade das TAIs a base de TBT, vários efeitos sobre organismos não alvo foram relatados na literatura devido, principalmente, a sua alta toxicidade e persistência ambiental (Graceli et al., 2013). Esse fato levou a Organização Marítima Internacional (OMI) a instituir o banimento global da utilização dos compostos organoestânicos em TAIs (Organização Marítima Internacional, 2005).

Nesse sentido, a demanda por alternativas livres de TBT se tornou mais evidente, levando a indústria naval a buscar substitutos para esse composto. Portanto, após o banimento do TBT, as tintas voltaram a incluir os óxidos de cobre e zinco como biocidas principais, podendo ser adicionados a sua formulação os compostos conhecidos como co-biocidas, utilizados principalmente para ampliar o espectro de toxicidade do cobre e do zinco e aumentar a eficiência anti-incrustante do produto (Almeida et al., 2007; Turner, 2010). Atualmente, 23 compostos, representantes de diferentes classes químicas, têm sido relatados na literatura como biocidas utilizados nas TAIs. Dentre eles, vale destacar: Diuron, Irgarol 1051, TCMTB (1,3 – Benzothiazol-2-ylsulfanyl) methyl thiocianato), DCOIT (4,5-Dichloro-2-n-octyl-3(2H)-isothiazol), Diclofluanida, Clorotalonil, Cu e Zn piritiona (Castro et al., 2011; Thomas and Brooks, 2010). Assim, até 4 co-biocidas podem ser simultaneamente utilizados em formulações de TAIs modernas (Okamura et al., 2000). Nos sistemas anti-

incrustantes com tecnologia de auto-polimento, a liberação dos biocidas a partir da matriz da tinta ocorre em uma taxa controlada. Nesses produtos os biocidas e co-biocidas são dispersos e contidos, mas não estão necessariamente quimicamente ligados (Omae, 2003). Desse modo, as tintas de auto-polimento possibilitam alcançar um desempenho previsível mantendo uma liberação constante dos biocidas por períodos mais longos de tempo.

Após um certo tempo, no entanto, a eficiência das TAI's diminui, devido a lixiviação dos biocidas para o ambiente aquático. A partir disso, ocorrem novas incrustações e há a necessidade de docagem para retirada do sistema anti-incrustante antigo e posterior aplicação de uma nova camada de tinta na embarcação (Almeida et al., 2007). Nesse processo, são geradas as partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs). PTAs de diferentes tamanhos e colorações são comumente avistadas em áreas de manutenção de embarcações (Turner, 2010). Assim, a variedade de tamanhos das PTAs está relacionada, principalmente, ao método escolhido para a remoção da tinta antiga. Diferentes autores relataram tamanhos variando entre 10 a 400 μm para PTAs coletadas em diferentes áreas de manutenção de embarcações no Reino Unido (Hasan et al., 2014; Singh and Turner, 2009a; Thomas et al., 2003). Além disso, a variação de tamanho dependerá também de processos de intemperismo e dispersão as quais as PTAs estão sujeitas no ambiente (Turner, 2010).

Devido aos diferentes compostos utilizados nas TAI's, as PTAs possuem uma grande heterogeneidade química em suas diferentes camadas (Singh and Turner, 2009a). Mesmo após sua utilização nas embarcações, alguns autores mostraram a presença de metais em altas concentrações, principalmente cobre e zinco (Parks et al., 2010; Singh and Turner, 2009; Turner et al., 2014, 2009). Além disso, metais e outros biocidas podem estar presentes nas camadas antigas, incluindo compostos já proibidos como o TBT (Singh and Turner, 2009a; Turner et al., 2014; Ytreberg et al., 2016). Em ambos os casos, têm sido reportada a presença

de concentrações significativas de substâncias químicas perigosas nessas PTAs (Hasan et al., 2014; Parks et al., 2010). Cabe ressaltar que o descarte inadequado desses resíduos no ambiente aquático pode contribuir para o enriquecimento desses compostos no ambiente (Holmes and Turner, 2009; Jessop and Turner, 2011; Singh and Turner, 2009b). Em sedimentos próximos a áreas de manutenção de embarcações no Reino Unido, Suécia e Brasil foi observada essa problemática, principalmente no que tange os metais Cu e Zn (Costa and Wallner-Kersanach, 2013; Eklund et al., 2014; Rees et al., 2014; Takahashi et al., 2012; Turner, 2013; Turner et al., 2008). Nesse sentido, o aumento na concentração de biocidas em sedimentos próximo às áreas de estaleiros e marinas, associado principalmente a água de lavagem das embarcações contendo PTAs (Thomas et al., 2002) e ao descarte desses resíduos no solo das áreas de manutenção (Eklund et al., 2014), tem sido relatado. Portanto, a necessidade de avaliar os efeitos que essas PTAs poderiam causar aos organismos aquáticos se tornou mais evidente.

Os efeitos das PTAs no ambiente foram relatados em poucos estudos, principalmente observando a acumulação de metais por organismos aquáticos. A acumulação, principalmente do metal Cu, lixiviado das PTAs quando misturado ao sedimento limpo, foi observada para a macroalga *Ulva lactuca* (Turner et al., 2009) e para o gastrópode *Littorina littorea* (Gammon et al., 2009). A biodisponibilidade dos metais ligados às PTAs é influenciada principalmente pela solubilidade dos compostos utilizados como pigmentos, aditivos, diluentes, dentre outros (Turner and Radford, 2010). O efeito tóxico resultante da exposição dos organismos às PTAs nos diferentes compartimentos do ambiente estuarino - água, sedimento integral e elutriado do sedimento – foram pouco estudados até o momento. Estudos envolvendo exposições ao elutriado de sedimentos fortificados com concentrações ambientalmente realísticas de PTAs, mostraram diminuição do crescimento da alga *U. lactuca* em concentrações de PTAs menores que 4 mg L⁻¹ (Turner et al., 2009). A toxicidade do elutriado de amostras de solo de estaleiro

contaminado com PTAs também foi identificada para organismos de diferentes níveis tróficos (bactéria, alga e copépodo) (Eklund et al., 2014). No entanto, sendo o sedimento o destino preferencial das PTAs nos ambientes estuarinos (Takahashi et al., 2012) se faz necessária a avaliação da toxicidade aguda e crônica no sedimento integral, principalmente para organismos estuarinos avaliando, se possível, as diferentes condições estuarinas de salinidade e os diferentes modos de interação dos organismos com o sedimento.

Apesar das PTAs serem consideradas uma fonte de contaminação por compostos biocidas e metais para os ambientes costeiros (Eklund et al., 2014; Takahashi et al., 2012; Thomas et al., 2002; Turner, 2013, 2010), seu mecanismo de transporte e distribuição nos ecossistemas aquáticos é ainda desconhecido, principalmente devido as dificuldades na identificação de pequenos fragmentos de tinta no sedimento (Turner, 2010). Harris et al. (1991) aplicaram um modelo numérico para o estuário de Tamar (Inglaterra) para simular a dispersão do TBT associado às PTAs. No entanto, a simulação não considerou o tamanho e a densidade das partículas. Assim, considerando que os diversos métodos utilizados para remoção da tinta podem produzir PTAs de diferentes tamanhos, formatos e densidades (Champ, 2003; Hasan et al., 2014; Singh and Turner, 2009a), sua mobilidade dentro do ambiente aquático precisa ser melhor investigada.

No que tange a geração de resíduos, a Convenção Internacional sobre o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos de Navios (AFS, em inglês) ressaltou no artigo 5, a necessidade da destinação adequada dos resíduos proveniente da retirada do sistema anti-incrustante contendo TBT das embarcações (Organização Marítima Internacional, 2005). Outras organizações também abordam essa temática em guias e manuais de boas práticas para coleta, armazenagem e destinação final das PTAs em áreas de manutenção de embarcações (British Marine Federation, 2005; Environment Canada, 1995; USEPA, 1997). No entanto, como apontado por vários estudos (Singh and Turner, 2009a; Takahashi et al., 2012; Turner,

2013, 2010), a ocorrência de PTAs em sedimentos estuarinos indica que a ausência de legislações específicas associado a falta de fiscalização, têm facilitado a destinação inadequada desse perigoso resíduo. Na América Latina como um todo, o total desconhecimento em relação ao tema, torna ainda mais necessária uma avaliação da problemática ambiental relacionada a presença das PTAs nos sedimentos estuarinos.

Capítulo II: Hipótese

O estuário da Lagoa dos Patos possui no seu entorno fontes potenciais de produção de partículas de tintas anti-incrustantes provenientes da manutenção de embarcações. Estas, devido ao descarte inadequado, atingirão o ambiente estuarino, sendo potencialmente danosas por ainda conter e liberar compostos químicos em concentrações capazes de causar toxicidade aos organismos aquáticos.

Capítulo III: Objetivos

Objetivo Geral

Investigar a problemática ambiental relacionada com a presença de partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos.

Objetivos específicos

1. Identificar as áreas fontes potenciais de PTAs no entorno do estuário da Lagoa dos Patos;
2. Identificar a ocorrência de PTAs nos sedimentos coletados em diferentes pontos do estuário da Lagoa dos Patos;
3. Investigar a composição química das PTAs coletadas nas áreas de manutenção de embarcações, bem como naquelas encontradas no sedimento coletado;
4. Entender como as características das PTAs afetam a sua dinâmica no estuário da Lagoa dos Patos;
5. Avaliar a presença de metais e biocidas orgânicos no sedimento coletado nas áreas fontes de PTAs e canal do estuário da Lagoa dos Patos;
6. Avaliar a toxicidade aguda e crônica das PTAs em diferentes compartimentos ambientais: água, sedimento integral e elutriato do sedimento;
7. Verificar o papel da salinidade na toxicidade das PTAs e o potencial tóxico da mistura dos metais Cobre e Zinco para o copépodo *Acartia tonsa*.

Capítulo IV: Área de estudo

A Lagoa dos Patos (LP) localizada no extremo Sul do Brasil (Figura 1), está inserida no maior sistema lagunar da América Latina, sendo considerada a maior lagoa do tipo “estrangulada” do mundo (Kjerve, 1986). Localizada entre 30° e 32° de latitude sul, essa lagoa possui cerca de 250 km de comprimento, 40 km de largura e 6 m de profundidade média, ocupando uma área de cerca de 10.000 km² (Moller et al., 2001). A hidrodinâmica da LP depende principalmente da relação entre a descarga de água doce e a ação do vento (Moller et al., 2001; Seeliger and Odebrecht, 2010). Os ventos nordeste (NE) dominam durante o Verão e Primavera, gerando um gradiente de pressão em direção a costa promovendo fluxos de vazante. No entanto, durante o Outono e Inverno, os ventos sudoeste (SO) se tornam importantes, o que favorece a penetração de água salgada na LP e fluxos de enchente (Fernandes et al., 2002; Moller et al., 2001). A área estuarina (1000 km²), se conecta com o oceano por um estreito canal, e possui um limite médio até a Ponta da Feitoria. No entanto, sob condições meteorológicas extremas, tais como: em estações secas associadas a La Niña onde ventos SO também são importantes, a água salgada pode alcançar a parte norte da lagoa (até 150 km a partir da entrada) (Moller & Castaing, 1999); e estações chuvosas associadas a eventos de El Niño, onde os ventos NE são predominantes, fazendo com que a penetração da água salgada fique restrita a entrada do canal na Barra de Rio Grande (Fernandes et al., 2002; Seeliger and Odebrecht, 2010).

Os rios e os tributários que desaguam na LP são os responsáveis pelo grande aporte de sedimento, no entanto, a erosão costeira das margens também contribui com essa introdução. A presença de esporões arenosos resultantes do transporte longitudinal de areia favorece a deposição do sedimento mais fino (Calliari et al., 2009). Todo esse aporte de sedimento pode

ser levado à plataforma continental, com a formação de bancos lamosos que podem chegar a região costeira através do transporte pela pluma de sedimentos (Calliari et al., 2009).

A área estuarina da LP vem sendo um receptor de efluentes urbanos, industriais e agrícolas, especialmente das cidades de Pelotas, Rio Grande e São José do Norte (Odebrecht et al., 2010). O tráfego naval é intenso na região do canal e em suas margens está situado o Porto de Rio Grande, o maior porto da região Sul (SUPRG, 2011). Além disso, no estuário da LP existem algumas instalações de manutenção de embarcações dedicadas, principalmente, a embarcações de pesca, de grande e médio porte (entre 10 e 27 m), e embarcações de lazer, além de portos pesqueiros onde ocorre manutenção de embarcações de pesca artesanal. Na região do complexo portuário existem também grandes estaleiros dedicados apenas a construção de plataformas de petróleo.

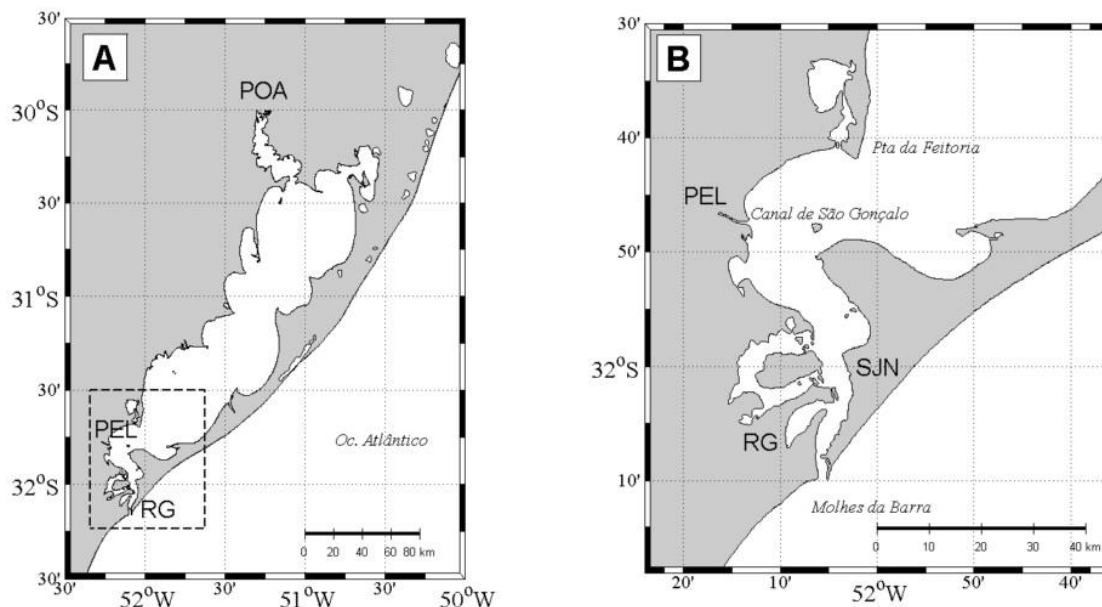


Figura 1: Área de estudo; (A) Visão ampla da LP, localizada no extremo Sul do Brasil conectada com o Oceano Atlântico; (B) Limites da área estuarina compreendida entre os molhes da Barra e a Ponta da Feitoria. Destaque para as cidades de Pelotas (PEL), Rio Grande (RG) e São José do Norte (SJN), as margens do estuário. Figura retirada de Àvila (2012).

Capítulo V:

Material e Métodos

1. Identificação das áreas fontes de partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs)

As áreas ao entorno do estuário da Lagoa dos Patos (LP) foram selecionadas devido a sua proximidade com a margem e por terem sido reportados em outros estudos como locais onde são realizados reparos de embarcações (Costa et al., 2016; Costa and Wallner-Kersanach, 2013). Com o objetivo de identificar as principais fontes potenciais de PTAs para o ambiente, visitas foram realizadas em estaleiros e outras áreas de manutenção de embarcações. As colônias de pesca selecionadas para visita foram as que possuíam mais de 100 embarcações cadastradas (Kalikoski and Vasconcellos, 2013). As visitas foram realizadas do início de 2013 ao final de 2014. Cada área foi caracterizada quanto a sua atividade de trabalho, frequência na manutenção das embarcações, métodos de retirada do sistema anti-incrustante antigo, marcas de tinta mais usadas e destinação final dos resíduos gerados. Os dados relacionados com o número de embarcações reparadas foram utilizados para identificar áreas que estariam potencialmente agindo como fontes de PTAs, estimando a produção para cada área de manutenção de embarcações.

2. Amostragem

2.1. Amostragem de sedimento

Baseada na pesquisa realizada nas áreas que atuam como fontes potenciais de PTAs, amostras de sedimento foram coletadas em frente a cada ponto. Além disso, amostras de sedimento também foram coletadas em 9 pontos ao longo do canal de acesso a LP, utilizado para navegação. Todas as amostras de sedimento foram coletadas entre setembro e dezembro

de 2014 utilizando uma draga de aço inoxidável tipo Van Veen, sendo coletados os primeiros cinco centímetros de sedimento. Após coleta, as amostras foram manipuladas e armazenadas de forma adequada para cada análise química. Para análise dos metais e identificação das PTAs no sedimento, as amostras foram coletadas com auxílio de espátula plástica e acondicionadas em sacos plásticos tipo zip-lock. Para análise dos compostos orgânicos, os sedimentos foram coletados com espátula de metal (previamente descontaminada) e acondicionados em caixas de alumínio previamente calcinados. As amostras foram congeladas assim que chegaram ao laboratório até o momento das análises.

2.2. Amostragem das PTAs

Durante as visitas às instalações de manutenção e estaleiros, foram coletadas PTAs de diferentes embarcações e com diferentes tempos de desgaste. Para cada amostra de PTA coletada foram obtidas informações sobre marca da tinta utilizada na embarcação, tempo de uso do sistema anti-incrustante e estado de inscrutação da embarcação. Foram coletadas PTAs de quatro marcas diferentes: (P1) Supermarine AF Ionex (Renner®), (P2) Epoxy Primer (marca não identificada) e (P5) W Marine Plus (Weg®), obtidas no Estaleiro Santos (Barra, Rio Grande); (P3) Tritão (Internacional®), e (P4) Microm Premium (Internacional®), obtidas no Yacht Club Rio Grande (Porto Velho, Rio Grande). Após a coleta e antes da realização das análises, as PTAs foram peneiradas e separadas por tamanho ($< 180 \mu\text{m}$ e $> 1\text{mm}$). As frações intermediárias obtidas durante o peneiramento não foram utilizadas nos testes, pois a amostra P1 apresentou as mesmas.

3. Triagem das PTAs no sedimento

Para avaliação e triagem das PTAs nas amostras de sedimento coletado em frente as áreas fontes, foi utilizada metodologia desenvolvida por Takahashi et al., (2012). Exatamente 100 g de amostra úmida foi pesada e passadas por peneira de $500 \mu\text{m}$ com o auxílio da adição

de alguns mililitros de água destilada. O material retido na peneira foi transferido para placas de petri e seco em estufa (45°C) por 12 h. Esse material foi então examinado em microscópio estereoscópio (com aumento de 5x). As PTAs visíveis foram retiradas de cada amostra com o auxílio de espátulas de plástico, pesadas em conjunto e estocadas em placas de petri para futuras análises. A seleção das PTAs a partir das amostras de sedimento levou em consideração características de cor e formato, permitindo diferencia-las dos demais materiais presentes na amostra (Turner, 2010).

4. Caracterização das PTAs

4.1. Análise qualitativa da composição elementar das PTAs do sedimento

Para caracterizar as PTAs retiradas do sedimento, devido a quantidade limitada de amostra, foi realizada uma avaliação qualitativa da composição elementar através de análise com a sonda de raio-X acoplada ao MEV (JOEL – JSM6610). Os fragmentos obtidos de cada amostra (n = 3 a 8) foram colados em uma fita dupla face de carbono e recobertos com uma fina camada de carbono. As condições para a análise foram: distância de trabalho de 11 mm e a uma tensão de 20 Kv. A análise qualitativa foi realizada pelo software NSS 3 Thermo Scientific. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.2. Análise dos compostos metálicos nas PTAs dos estaleiros

Para análise dos compostos metálicos, aproximadamente 0,2 g de PTAs foram pesadas, e 6 mL de HNO₃ e 1 mL de HF, ambos concentrados, adicionados. A digestão foi realizada em um forno micro-ondas (modelo Speedwave 4, Berghof, Alemanha) usando o seguinte programa de irradiação: i) mantendo por 15 min a 180 °C (rampa de aquecimento de 10 min) e ii) mantendo por 20 min a 50 °C (rampa de aquecimento de 5 min). O conteúdo da digestão foi diluído em 100 mL sendo posteriormente determinados os compostos Mn, Cr, Ni, Pb, Sn, Zn e Cu por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-

OES, Optima 4300 DV, Perkin Elmer, USA). Os comprimentos de onda monitorados foram: 267,716 nm (Cr), 259,372 nm (Mn), 231,604 nm (Ni), 220,353 nm (Pb), 189,991 nm (Sn), 324,752 nm (Cu) e 206,200 (Zn). A acurácia da análise foi determinada pela análise dos elementos nos materiais certificados ((PACS-2 e MESS-2). Os limites de quantificação (LQ) dos metais foram 2,0, 0,7, 1,8, 7,2, 7,8, 6,6 e 6,9 $\mu\text{g g}^{-1}$, para Cr, Mn, Ni, Pb, Sn, Cu e Zn, respectivamente. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.3. Análise dos compostos orgânicos

A extração dos compostos biocidas orgânicos Irgarol 1051, Diuron, DCOIT e TCMTB foi realizada de acordo com a metodologia de Martínez e Barceló (2001) e Harino et al. (2005), com modificações realizadas por Abreu (2016) e adaptações para as PTAs. Aproximadamente 0,1g de PTAs foram pesadas e adicionadas em frascos de vidro âmbar. As amostras foram fortificadas com 10 ng L⁻¹ de atrazina D5 (100 ng L⁻¹ do padrão de recuperação), sendo adicionados posteriormente 10 mL de acetronitrila. As amostras foram então agitadas por 1 min, sonificadas (30 min a 50°C) e então centrifugadas (7 min a 4000 rpm). O sobrenadante foi recolhido e esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Os sobrenadantes foram combinados e evaporados (Syncore®) a 1 mL. Após a redução de volume, os extratos foram limpos por extração em fase sólida (EFS) usando cartuchos de C18 previamente ativados com 4 mL de acetato de etila (Merk®) e água ultrapura (Milli-Q®). Os extratos foram diluídos com 50 mL de água ultra pura, passados através dos cartuchos do EFS, secos por 1h e então eluídos com 2 vezes 2 mL de acetato de etila. Os eluatos foram secos sob o fluxo de nitrogênio até 1 mL antes de serem transferidos para um novo frasco com metanol. A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia de fase líquida (Alliance Separations, modelo 2695, Waters (Milford, MA, USA), equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, detector de espectrometria de

massas LC-MS (Micromass® Quatro Micro™ API Waters) com fonte API, utilizando modo de ionização por “eletrospray”, sistema de aquisição de dados através de software Masslynx 4.0 Waters e uma coluna analítica XTerra® C18 3,5 µm 144 Å (50 x 3 mm d.i.) (Waters, Millford, MA, EUA). A fase móvel utilizada foi composta por água acidificada com ácido acético (0,1%) e metanol, no modo de eluição de gradiente. A pressão do gás de nebulização foi de 50 psi e o volume injetado de amostra foi de 10 µL.

4.4. Tempo de deposição das PTAs

O tempo de deposição das PTAs foi medido com o auxílio de uma proveta de 1L preenchida com água sintética na salinidade 15, considerando uma salinidade intermediária do estuário. Aproximadamente 150 mg de cada amostra de PTAs coletada nas áreas de manutenção de embarcação (P1, P2, P3 e P4, conforme descritas no item 2.2), separadas em duas diferentes classes de tamanho ($> 1\text{mm}$ e $< 180\ \mu\text{m}$) foram pesadas, e o tempo de queda foi cronometrado até que elas atingiam o fundo da proveta (15 cm). As observações foram realizadas no tempo de início (T0) e após 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24h, e a posição das PTAs foi visualmente marcada na proveta. O teste foi realizado duas vezes e em duas condições distintas: com e sem agitação (30 rpm).

5. Ensaio de toxicidade com sedimento

5.1. Fortificação

Para a realização dos ensaios foi coletado sedimento em área livre de tráfego naval e isento dos contaminantes de interesse (dados não publicados), sendo neste trabalho classificada como área controle (Pesqueiro, Lagoa dos Patos). O sedimento foi caracterizado quanto a sua granulometria e percentual de carbono orgânico e armazenado sob refrigeração até o uso nos testes. A fortificação foi realizada de acordo com o manual técnico da USEPA (2001). No primeiro experimento, foram utilizadas as PTAs P4 (ver item 2.2) obtidas no Yacht Clube Rio Grande. Para exposição dos copépodos *Nitokra* sp., 50 g de sedimento seco

foram adicionados a erlenmeyers juntamente com 5 mL de água destilada. Foram adicionadas as concentrações de PTAs necessárias para o experimento (as concentrações serão descritas com mais detalhes no tópico de cada ensaio) e os frascos foram agitados continuamente em mesa agitadora orbital (shaker) por 5 dias (50 rpm). No segundo experimento, com os organismos *Hyalella azteca* e *Monokalliapseudes schubarti*, por se tratar de uma maior massa de sedimento a ser homogeneizada, outra metodologia descrita no mesmo manual técnico da USEPA foi utilizada. Para o mesmo, foram utilizadas as PTAs P1 (ver item 2,2) coletadas no Estaleiro Santos, em Rio Grande. Assim, 2500 g de sedimento foram pesados, sendo que 25% dessa massa foi liofilizada por 48h e desagregado. Após esse procedimento, foram adicionadas ao sedimento seco as concentrações de PTAs pertinentes ao ensaio, sendo então homogeneizados por 6h em uma mesa giratória para homogeneização (rotação de 40 rpm). Após esse procedimento, os 75% restantes do sedimento úmido e a umidade perdida na secagem, foram incorporados para uma nova etapa de homogeneização por mais 6h. O processo de fortificação foi realizado em sala com temperatura controlada (20 ± 2 °C) e ausência de luminosidade.

5.2. Preparo do elutriato dos sedimentos fortificados

O elutriato dos sedimentos fortificados foi preparado de acordo com a metodologia da USEPA (2001), onde 4 partes de água para 1 parte de sedimento foram acondicionados em erlenmeyers de 1 L e agitados por 1h no shaker (50 rpm). Após, o frasco foi deixado em repouso para decantação por 1h. O sobrenadante foi retirado e imediatamente utilizado para a exposição dos organismos.

5.3. Ensaio de toxicidade com os organismos *Hyalella azteca* e *Monokalliapseudes schubarti*

5.3.1. *Hyalella azteca*

Estabelecimento do cultivo

Os anfípodos da espécie *H. azteca* foram primeiramente cedidos pela empresa Aplysia Soluções Ambientais e seu cultivo estabelecido no Laboratório de Contaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) de acordo com a norma NBR 15470 (ABNT, 2007), seguindo posteriormente adaptações sugeridas por Zamboni (2000) para cultivos realizados em água salgada. A metodologia detalhada referente ao cultivo e aos testes de sensibilidade realizados com *H. azteca*, que foram realizados em concomitância com o presente trabalho, está publicada na monografia de Silva (2015). Os organismos foram gradualmente aclimatados da água doce para salgada até atingir a salinidade 5 e mantidos em sala com fotoperíodo (12h Claro:12h escuro) e temperatura (25 ± 2 °C) controlados, sob aeração branda. As trocas totais do meio de cultivo foram realizadas semanalmente e os parâmetros pH, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) (Hanna Instruments® – Multiparâmetros edge modelo HI2020-02-) foram verificados anteriormente a troca dos organismos. A separação dos organismos foi realizada de modo a obter organismo de idade adequada ao teste (de 7 a 14 dias de vida). Como substrato para fixação dos organismos, foram utilizados pequenos pedaços de tecido e plantas artificiais e a alimentação foi fornecida diariamente, sendo constituída por uma mistura de ração de peixe (alcon Basic®) e levedura (fleischmann®) com adição de óleo de prímula (Dermaco Famácias) complementada com Spirulina (alcon®).

Ensaio de toxicidade com sedimento integral

Os ensaios foram realizados de acordo com a norma NBR 15470 (ABNT, 2007) com modificações para a água salgada. Foram utilizados 100 g de sedimento fortificados com

PTAs nas concentrações de 0,01, 0,04, 0,14, 0,49 e 1,50% (massa: massa), e 200 mL de água de diluição (água marinha autoclavada diluída com água destilada para alcançar a salinidade 5). O ensaio teve duração total de 10 dias e ao longo de sua realização, a cada 2 - 3 dias, era realizada a renovação de 2/3 da água de diluição e alimentação (1 mL de ração composta). Após um curto período de equilíbrio entre a água o sedimento (12h) os organismos foram expostos sendo utilizados 50 organismos por tratamento, sendo 10 organismos em 5 réplicas. Os ensaios foram mantidos nas mesmas condições do cultivo (fotoperíodo: 12hC:12hE; temperatura: 25 ± 2 °C; aeração branda constante). A resposta avaliada no teste foi a mortalidade, sendo contabilizados os organismos vivos e mortos ao final do teste para o cálculo da CL₅₀.

Ensaio de toxicidade com elutriato do sedimento

Para o ensaio foram utilizados 100 mL do elutriato em cada unidade experimental que contou com 5 organismos distribuídos nas 4 réplicas, totalizando 20 organismos por tratamento. O ensaio teve duração de 96h e foi realizado nas mesmas condições do teste com sedimento integral (fotoperíodo: 12hC:12hE; temperatura: 25 ± 2 °C), porém, sem aeração e alimentação dos organismos. Ao final do teste organismos vivos e mortos foram contabilizados para o cálculo da CL₅₀.

5.3.2. *Monokalliapseudes schubarti*

Ensaio de toxicidade com sedimento integral

Cerca de 1000 organismos foram coletados às margens do estuário da Lagoa dos Patos, próximo aos molhes da Barra (Rio Grande – RS) e levados ao laboratório para aclimação. A metodologia de exposição dos organismos foi baseada em Zamboni & Costa (2002). As condições de aclimação e teste de sensibilidade também foram descritos na monografia de Silva (2015).

Para os ensaios de exposição do *M. schubarti* com o sedimento integral, foram utilizados 150 g de sedimento fortificado (mesmas concentrações do teste com *H. azteca*, 0,01, 0,04, 0,14, 0,49 e 1,50% massa:massa) e 300 mL de água de diluição (água marinha autoclavada diluída com água destilada para alcançar a salinidade 5). No teste foram utilizados 50 organismos por tratamento, sendo 10 organismos distribuídos nas 5 réplicas. O teste não contou com renovação de água e a alimentação foi fornecida apenas no início do teste (1 mL de ração composta). O teste teve duração de 10 dias, sendo ao final avaliada a mortalidade através da contagem dos organismos para o cálculo da CL₅₀.

Ensaios de toxicidade com elutriato do sedimento

Os ensaios para exposição do *M. schubarti* ao elutriato do sedimento foi realizado concomitante com o de *H. azteca*. Foram utilizados 100 mL do elutriato em cada unidade experimental que contou com 5 organismos distribuídos nas 4 réplicas, totalizando 20 organismos por tratamento. O teste teve duração de 96h e foi realizado nas mesmas condições do ensaio com sedimento integral (fotoperíodo: 12hC:12hE; temperatura: 20 ± 2 °C), porém, sem aeração e alimentação dos organismos. Ao final foi avaliada a mortalidade com a contagem dos organismos vivos e mortos para o cálculo da CL₅₀.

Para ambos os ensaios, sedimento integral e elutriato, e ambos organismos, a validação se deu pela sobrevivência de no mínimo 80% dos organismos no tratamento controle (ABNT, 2007; Zamboni & Costa, 2002).

Antes dos ensaios os lotes de organismos utilizados no teste foram expostos à substâncias de referência (Silva, 2015). Além disso, os parâmetros de qualidade da água como temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e salinidade foram medidos no início e final de cada teste.

Para os ensaios com os organismos *H. azteca* e *M. schubarti* as PTAs foram obtidas durante a manutenção de uma embarcação de pesca, no Estaleiro Santos, na Barra de Rio

Grande. De acordo com o responsável pela manutenção da embarcação, a mesma estava pintada com a tinta do modelo Supermarine AF Ionex, marca Renner.

5.4. Ensaio de toxicidade com o organismo *Nitokra sp.*

5.4.1. Ensaio de toxicidade crônica no sedimento integral

Os copépodos harpaticóides foram obtidos de uma cultura estoque estabelecida no laboratório CONECO desde 2010. Os organismos foram cultivados sem aeração em água marinha sintética com a adição de sal marinho utilizado (Coralife®), salinidade 10 ± 1 , temperatura 25 ± 2 °C e fotoperíodo 16 h claro e 8 h escuro (Lotufo & Abessa, 2002).

O ensaio crônico foi realizado avaliando a taxa de fecundidade (Lotufo & Abessa, 2002) utilizando o sedimento integral fortificado com as PTAs, nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,25, 1,25 e 6,25% (massa: massa). Foram estabelecidas três repetições por tratamento, usando 2 g de sedimento com 15 mL de água de exposição (salinidade 10). Após um curto período de equilíbrio (12h), cinco fêmeas ovadas foram adicionadas em cada unidade experimental e alimentadas apenas no início do teste com 1 mL de solução de ração de peixe. Os ensaios foram mantidos nas mesmas condições descritas do cultivo (salinidade 10, temperatura 25 ± 2 °C, fotoperíodo 12hC:8hE, sem aeração). Após 10 dias de exposição, 1 mL da solução de formol e corante rosa bengala (4%) foi adicionado às amostras para preservar e facilitar a identificação dos organismos em seus diferentes estágios de desenvolvimento. Os organismos corados (adultos, náuplios e copepoditos) foram contados utilizando um microscópio estereoscópio e a taxa de fecundidade expressada como a média do número da prole por adulto.

5.4.2. Ensaio de toxicidade aguda com o elutriado do sedimento

O ensaio agudo com o elutriado do sedimento (preparado como descrito no item 5.2) foi realizado com a adição de 30 organismos adultos adicionados a cada 3 réplicas de um tratamento com duração de 96h, nas mesmas condições de exposição do ensaio com

sedimento integral (no entanto, sem a adição de alimento). Após o período de exposição, os organismos vivos e mortos foram contados e os resultados expressos pela concentração que causou a morte de 50% dos organismos expostos (CL_{50}).

Antes de cada ensaio, o lote de organismos do cultivo a ser utilizado foram testados quanto a sua sensibilidade pela exposição ao composto Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) nas concentrações de 4, 6, 8, 10 e 12 mg L⁻¹, além do controle. Os parâmetros temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade foram medidos (Hanna Multiparameters Edge HI2020-02) em todas as amostras no início e final dos testes.

Para os ensaios com o organismo *Nitokra sp.*, as PTAs foram obtidas durante a manutenção de uma embarcação de lazer, no Yacht Club Rio Grande. De acordo com o responsável pela manutenção da embarcação, a mesma estava pintada com a tinta do modelo Micron Premium, marca Internacional.

6. Ensaio com o lixiviado das PTAs

6.1. Preparo do lixiviado

Para obtenção das PTAs preparadas em laboratório, uma camada da tinta anti-incrustante Supermarine AF Ionex MB® (Renner), cedida pelo Estaleiro Santos (Barra da cidade do Rio Grande), foi aplicada em placas de vidro (30 x 30 cm) e então deixadas secando por 48h. Após a secagem, a tinta foi raspada com o auxílio de uma espátula de aço inox e as partículas geradas acondicionadas em um recipiente de vidro previamente limpo. A amostra, cerca de 10 g, foi seca sob fluxo de N₂ e peneirada para obter um tamanho homogêneo.

O lixiviado foi preparado pela adição de 1,25 g de PTAs em 1 L de água marinha artificial nas salinidades 5, 15 e 30, proporcional a 1,25% de massa de PTAs por volume. O lixiviado foi matando em agitação por 7 dias (mesa agitadora orbital a 40 rpm) de acordo com metodologia proposta por Turner et al. (2008), em temperatura controlada (20 ± 2 °C) e sem

iluminação. Após os 7 dias de agitação, o lixiviado foi filtrado em um funil de buchner com poros de 3 mm e o filtrado foi imediatamente utilizado nos ensaios de toxicidade.

6.2. Ensaio de toxicidade aguda com o organismo *Acartia tonsa*

Os copépodos eurialinos da espécie *A. tonsa* tem seu cultivo estabelecido no laboratório CONECO desde 2006. Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados de acordo com a metodologia descrita na ISO 14669 (1999). O lixiviado (solução estoque) foi diluído nas seguintes concentrações: 45, 15, 5 e 1% da solução estoque em 1 L de água salina artificial nas três salinidades (5, 15 e 30) para realização dos ensaios. O ensaio foi realizado adicionando 40 organismos adultos, sem distinção sexual, divididos em 100 mL de tratamento em cada 4 réplicas. Os resultados de toxicidade foram expressos em CL_{50} das diluições em cada salinidade.

Os testes foram realizados em sala com temperatura controlada a 22 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro, por 48h. Os organismos vivos e mortos foram contados e o teste era considerado válido quando a mortalidade no controle era menor que 10%. Antes de cada ensaio o lote de organismos do cultivo a ser utilizado, foi testado quanto a sua sensibilidade pela exposição ao composto DSS nas concentrações de 4, 6, 8, 10 e 12 mg L⁻¹, além do controle. Os parâmetros temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade foram medidos (Hanna Multiparameters Edge HI2020-02) em todas as amostras no início e final dos ensaios.

6.3. Ensaio com adição de quelantes

Após a determinação da CL_{50} da solução do lixiviado em cada salinidade, os ensaios foram repetidos com essa concentração, no entanto, com a adição dos quelantes EDTA e tiosulfato de sódio na concentração de 100 mg L⁻¹ cada. Para esses ensaios foram preparados quatro tratamentos em cada salinidade: controle (CONT), controle + quelantes, CL_{50} (de cada salinidade) e CL_{50} + quelantes. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descrita no item 6.2 para os testes com *A. tonsa*. Da mesma forma, foram realizados ensaios de

sensibilidade com o lote utilizado e os mesmos parâmetros (temperatura, pH, OD e salinidade) foram monitorados no início e final dos ensaios.

Os ensaios de toxicidade realizados na presente tese contaram com autorização do comitê de ética em uso animal (CEUA) da FURG (Processo nº 23116.004588/2014-82), além da autorização para coleta e utilização dos organismos com finalidade científica emitida pelo SISBIO (número: 42053-2).

7. Análises químicas dos meios de exposição

Todos os meios de exposição utilizados nos ensaios, sedimento integral fortificado, elutriato do sedimento fortificado e lixiviado, foram analisados quanto a presença dos compostos químicos de acordo com o interesse de cada trabalho realizado. As análises dos compostos metálicos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.2 e as análises dos compostos orgânicos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3, alterando somente a massa de sedimento e quantidade de solvente utilizados nas análises, sendo 1 g e 20 mL, respectivamente.

7.1. Análise dos compostos metálicos nas amostras aquosas

As amostras aquosas, elutriato do sedimento e lixiviado, foram analisadas quanto a presença dos compostos metálicos. Alíquotas das amostras (cerca de 10 mL) foram filtradas (0,45 µm), adicionadas em tubos falcon previamente acidificados e então acidificadas com a adição de 250 µL de HNO₃ (Vetec). Os metais foram determinados por espectroscopia de absorção atômica em modo chama (ContrAA 700). A curva de calibração foi realizada com o padrão multi-elementos (Merck). Os elementos determinados no elutriato foram Mn, Cr, Ni, Pb, Sn, Cu e Zn sendo seus respectivos limites de quantificação (LQ) 18, 47, 57, 17, 35, 14 e 10 µg L⁻¹, enquanto que no lixiviado foram determinados apenas os elementos Cu e Zn. As análises foram realizadas no Instituto de Ciências Biológicas da FURG.

8. Análises dos dados

Antes das análises estatísticas, os dados foram verificados quanto a normalidade e homogeneidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A diferença entre as médias dos tratamentos de exposição e a concentração dos compostos analisados foi avaliada através do teste ANOVA, de uma e duas variáveis independentes, dependendo do conjunto de dados, seguido por testes pós hoc (Tukey e Bonferroni). A relação entre a toxicidade e a concentração de metais foi verificada através da correlação de Spearman. Todos os testes foram aplicados com um nível de significância de 95 % e utilizando o software GraphPad Prism (v 5.02 para Windows, San Diego, EUA). Os valores de CL₅₀ foram determinados utilizando o teste Trimmed Spearman Kabber (Hamilton et al., 1975).

Capítulo VI: Artigos Científicos

Para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, é requerido que o discente realize a submissão de pelo menos dois artigos científicos como primeiro autor em periódico com corpo indexado, sendo um deles aceito. Desse modo, os resultados da pesquisa desenvolvida durante o período do doutorado e a discussão dos resultados serão apresentados em forma de artigos neste Capítulo. O primeiro manuscrito, de autoria de Sanye Soroldoni, Ítalo Braga de Castro, Fiamma Abreu, Fabio Andrei Duarte, Osmar Olinto Moller Jr, Gilberto Fillmann e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado “***Antifouling paint particles: Comparing sources, confirming environmental presence, describing dynamics and chemical composition***” e será submetido ao periódico “***Environmental Pollution***”. O segundo manuscrito, de autoria de Sanye Soroldoni, Fiamma Abreu, Ítalo Braga de Castro, Fábio Andrei Duarte e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado “ ***Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?*** ” foi publicado no periódico “ ***Journal of Hazardous Materials***”. O terceiro manuscrito, de autoria de Sanye Soroldoni, Samantha Vieira da Silva, Ítalo Braga de Castro, Camila de Martinez Gaspar Martins e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado “**Influência da interação organismo-sedimento na toxicidade das partículas de tintas anti-incrustantes**” e será submetido em periódico a ser definido. O quarto manuscrito, de autoria de Sanye Soroldoni, Ítalo Braga de Castro, Samantha Eslava Martins e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado “**Potential toxicity of metals**”

leachate from antifouling paint particles under different salinities” e será submetido ao periódico “*Ecotoxicology and Environmental Safety*”.

Antifouling paint particles: sources, occurrence, composition and dynamics

Sanye Soroldoni¹, Ítalo Braga Castro², Fiamma Abreu¹, Fabio Andrei Duarte³, Osmar Olinto Möller Jr¹, Gilberto Fillmann¹, Grasiela Lopes Leães Pinho^{1*}

1-Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (IO -FURG). Av. Itália s/n, Campus Carreiros, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

2- Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo (IMAR-UNIFESP). Av. Almirante Saldanha da Gama, 11030-400, Santos, SP, Brazil

3 - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Email of corresponding author: *grasielapinho@furg.br*

Abstract

Sources, occurrence, composition and dynamics of antifouling paint particles (APPs) were evaluated in Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. Ten areas including boatyards, a marina and artisanal fishing harbours were identified in the estuarine system as potential sources of APPs. The APPs generated in these areas were highly heterogeneous considering the size, shape and composition. Based on an estimate of antifouling paint usage and amount of boats in each studied area, artisanal fishing harbours could be the main source of particles to Patos Lagoon estuary. However, relatively high amounts of APPs, which ranged from 130 to 40,300 $\mu\text{g g}^{-1}$, were detected in sediments collected in front of boatyards and studied marina. The uneven distribution of APPs levels among the sediment samples were probably due to the presence of diffuse sources (fishing harbours) associated to “hotspots” (boatyards and marina) along the study area. Additionally, data of settling experiment indicate that water agitation, size, shape and density combined to the local hydrodynamics, appears to contribute to the mobility of these residues within the estuary. In the main channel of Patos Lagoon estuary, smaller particles tend to be transported to adjacent coastal zone while in the sediment surface of sheltered areas, particles tend to be deposited. Since different trace metals, such as Cu, Zn,

Pb and Sn, and booster biocides as Irgarol 1051, Diuron and DCOIT were still found in APPs from boats located in source areas, if not disposed correctly, these particles can be considered as an important source of contamination to Patos Lagoon estuary. The absence of both legislation and control may suggest that APPs represent an environmental problem in Brazilian coastal areas, highlighting the necessity of improvements in boat maintenance process in Brazilian facilities that avoid the release of APPs into the aquatic systems.

Keywords: Antifouling paint particles, fishery harbours, Biocides, Metals, boatyards

1. Introduction

Antifouling paints are used as protective coatings on ship and boat hulls to prevent the attachment of marine biofouling such as bacteria, macroalgae, mussels and other invertebrates (Almeida et al., 2007; Yebra et al., 2004). This biological settlement is recognized as promoting adverse effects for maritime navigation, such as speed reduction due to the high friction; higher fuel consumption; increase periodical dry-docking operations, and generation of high amount of toxic waste (Kotrikla, 2009). Several compounds have been used to formulate antifouling paints (Almeida et al., 2007; Castro et al., 2011; Thomas and Brooks, 2010) and up to 4 different organic or organometallic biocides may be used simultaneously in commercial formulations to booster the toxicity of Cu and Zn (Okamura and Mieno, 2006). After application, the biocides used in antifouling paints are gradually leached from the coatings ending up in the water column. Thus, the efficiency as antifouling reduces over time requiring a new paint application (Almeida et al., 2007; Singh and Turner, 2009a).

The removal of old antifouling paint coating leads to the production of antifouling paint particles (APPs), and this activity usually happens on boat maintenance facilities and shipyards (Singh and Turner, 2009a; Tolhurst et al., 2007; Turner et al., 2008). Considering the lack of residue management by shipyards, the APPs generated during the maintenance procedures often reach the adjacent aquatic environments (Kotrikla, 2009). After reaching the

water column, their transport can be influenced by different hydrodynamic processes including deposition, resuspension, advection and bioturbation (Turner, 2010). Although APPs may be a considerable contamination source of antifouling biocides to coastal environments (Eklund et al., 2014; Thomas et al., 2003; Tolhurst et al., 2007; Turner, 2013), their mechanisms of transport and consequent spatial distribution in aquatic systems are still unknown, mainly due to the difficulties on identification of small paint fragments (Turner, 2010). Harris et al. (1991) applied a numerical model for the Tamar estuary (England) to simulate the dispersion of Tributyltin (TBT) associated to APPs. However, that simulation did not consider the particle size as well as the density of APPs. Thus, considering that the methods used for paint removal and application layers may produce APPs with different size, shape and density (Champ, 2003; Hasan et al., 2014; Singh and Turner, 2009b), their transport within the aquatic environment needs to be further investigated.

The Antifouling System Convention (AFS), issued by the International Marine Organization (IMO), highlights the importance of antifouling waste management to decrease and prevent aquatic contamination (IMO, 2008). However, in many countries effective methods for waste disposal were not clearly established or usually done (Champ, 2003). Thus, considering the lack of specific regulations in South America for correct APPs disposal, the present study investigated if APPs represent an environmental problem in Southern Brazil. Therefore, APPs were assessed by sources, occurrence, chemical composition, and environmental dynamics in Patos Lagoon estuary, a coastal area under the influence of heavy maritime traffic in Southern Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Study area

Patos Lagoon (PL) (Figure 1) is located in Southern Brazil, being the world largest choked lagoon (Kjerfve, 1986). It has 250 km in extension, and is connected to Atlantic Ocean through a narrow inlet (less than 1 km wide). The PL hydrodynamics depends mainly on the relationship between freshwater discharge and wind action (Moller et al., 2001, 1996). Northeasterly (NE) winds dominate during summer and spring and generate a pressure gradient towards the coast promoting ebb fluxes. However, during autumn and winter, Southwesterly (SW) winds become important, which favors flood fluxes with seawater penetration into PL (Fernandes et al., 2002; Moller et al., 2001).

The estuary is located in the end of PL, covering about 10% of its total surface (Figure 1). However, the estuarine limit, may changes depending on the weather conditions. During extreme meteorological conditions associated to La Niña, seawater can reach up to 150 km into the Lagoon due to the intense dry season associated to the SW winds (Möller and Castaing, 1999). On the other hand, seawater penetration can be restricted to the entrance channel during El Niño due to the intense rainy season associated to NE winds (Fernandes et al., 2002). Naval traffic is intense in this region, with boat maintenance facilities dedicated mainly to fishing and leisure boats. In addition, big shipyards were dedicated mainly for building of oil platforms.

2.1. Appraisal of potential sources of antifouling paint particles

Aiming to identify the main sources of antifouling paint particles (APPs), sites visited between 2013 and 2014 were selected by the proximity with Patos Lagoon (PL) estuary and reported in other studies as boat maintenance facilities, such as boatyards and marinas (Costa et al., 2016; Costa and Wallner-Kersanach, 2013). Also, fishing harbours were selected to be visited and were chosen those with more than 100 fishermen registered (Kalikoski and

Vasconcellos, 2013). Each area was characterized regarding their working activity, frequency of boat maintenance, method of paint removal, brands used and waste destination. These data related to the number of vessels repaired were used to identify areas potentially acting as sources of APPs estimating the production for each potential maintenance facility (Fig 1a).

2.2. Sampling

2.2.1. *Sediment samples*

Sediment samples were collected in front of each site identified as potential source of APPs and along the main navigation channel (Figure 1). All surface sediment samples were collected between September and December of 2014, using a stainless steel Van Veen dredge. After collection, the samples were stored and frozen as soon as they arrived in the laboratory.

2.2.2. *APPs from boat hulls*

APPs from five different products were manually collected during the maintenance procedures at two different areas. APPs were collected off the floor, selected by color and shape, using inox tweezes and stored in zip lock bags. Prior to sampling, the antifouling paint used by each boat was identified by checking on the board register. The APPs were obtained by removing Supermarine AF Ionex (Renner®) paint (named P1), Epoxy primer (brand was not identified) (named P2) and W Marine Plus (Weg®) (named P5) at Santos shipyard, and Tritão (International®) paint (named P3) and Microm Premium (International®) paint (named P4) at Rio Grande Yacht Club. After sampling, APPs were sieved ($< 180 \mu\text{m}$ and $> 1 \text{ mm}$) and each fraction was stored for additional analyses. Only the APP P1 showed fractions between 1 mm and $180 \mu\text{m}$ that were not used for these analyses because did not have enough content.

2.3. Occurrence

2.3.1. APPs occurrence screening

APPs were identified by color and shape among the sediments grains. The occurrence of APPs in each sediment sample was assessed according to Takahashi et al. (2012). Sediment samples were weighted (about 100 g) and sieved through 500 μm pore size nylon by adding few milliliters of distilled water. Coarse remaining material on the sieve was transferred to petri dishes, and dried during 24 h at 45 °C. This material was examined using a stereo microscope (5x magnification). Visible APPs were retrieved from each sample using plastic tweezers, weighed as a composite, and stored in petri dishes for additional analysis.

2.3.2. Environmental occurrence of booster biocides and metals

The occurrence of the booster biocides - Irgarol 1051, Diuron, TCMTB and DCOIT – and the metals Mn, Ni, Cr, Pb, Cu, Sn and Zn was investigated in sediments collected in PL estuarine channel and in front source areas (Fig. 1). The methodology used to analyze these compounds was described below in more details.

2.4. Chemical composition

The methodologies described below were used to determine the chemical composition of APPs collected from boats and the occurrence of metals and more common booster biocides in sediments collected in front of sources areas and in the PL navigation channel (Fig. 1a).

2.4.1. Metal analysis

Metal composition of APPs and sediments was determined according to explained in Soroldoni et al. (2017). About 0.2 g of APPs and sediments were weighted, followed by addition of 5 mL of concentrated HNO_3 (65%, 14.4 mol L^{-1} , Sigma-Aldrich) and 1 mL of concentrated HF (40%, 23 mol L^{-1} , Merck). The digestion was performed in a microwave oven (model Speedwave four, Berghof, Germany) using the following irradiation program: *i*)

ramp of 10 min up to 180 °C and hold for 20 min and *ii*) hold for 20 min at 50 °C. Digests were diluted to 25 mL in ultrapure water, with successive dilutions (5 to 2000 times, depending on the sample) previously to the determination of Cr, Mn, Ni, Pb, Cu, Sn and Zn. The elements were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) using a spectrometer model Spectro Ciros CDD (Spectral Analytical Instruments, Kleve, Germany). The monitored wavelengths were 267.716 nm (Cr), 259.372 nm (Mn), 231.604 nm (Ni), 220.353 nm (Pb), 324.752 nm (Cu) 189.991 (Sn) and 206.200 (Zn). The accuracy was evaluated by elements determination in two certified reference materials (CRMs) of marine sediment (PACS-2 and MESS-2). All samples and CRMs were analyzed in triplicate.

2.4.2. *Organic booster biocide analysis*

Booster biocides Irgarol 1051, Diuron, TCMTB and DCOIT were analyzed according to Soroldoni et al. (2017). About 0.1 g of APPs and 1 g of dried sediments were weighted in 25 mL glass vials. Extraction was performed by adding of 10 mL of acetonitrile and spiked with 10 ng L⁻¹ of Atrazine D₅ (100 ng L⁻¹ stock solution, surrogate standard). Samples were mixed for 1 min, sonicated (Ultrasonic bath, 40 kHz, 132 W, 50 °C for 30 min) and centrifuged (4,000 rpm for 7 min). This process was repeated three times. The extracts were diluted to 50 mL with ultrapure water, passed through SPE cartridges, dried for 1 h and then eluted 2 x 2 mL of ethyl acetate. The eluates were decreased by volume under nitrogen flow up to 1 mL and further transferred to a new vial, followed by adding methanol up to final volume of 1 mL. All extracts of APPs and sediment were also analyzed in triplicate. Chromatographic analyses were carried out in a Liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem mass spectrometry - LC-ESI-MS/MS (Alliance Separations, model 2695, Waters - Milford, USA) using a Waters X Terra MS C18 column (3.0 x 50 mm, 3.5 µm) and mobile phase composed by 0.1% acetic acid:methanol. The limits of detection (LOD)

were 0.1 ng g^{-1} for Diuron, Irgarol 1051 and TCMTB, and 0.5 ng g^{-1} for DCOIT. The limits of quantification (LOQ) were 0.5 ng g^{-1} for Diuron, Irgarol 1051 and TCMTB, and 1.5 ng g^{-1} for DCOIT.

2.4.3. Scanning electron microscopy

APPs obtained from each sediment samples, and from boats were analysed by scanning electron microscopy coupled to energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS) to confirm their origin. This powerful technique has been used to identify the elemental composition of a particular area, since the intensity of X-rays emitted by each element presents direct relationship with its concentration (Goldstein et al., 2003). Analyses were performed using a scanning electron microscope (model JSM-6610, JEOL, Peabody, USA) operated at 20 kV and 11 mm of working distance. Fragments were glued in a double-sided carbon tape and sputter-coated with a thin film of carbon. Qualitative elemental analysis was performed using the NSS 3 Thermo Scientific software.

2.5. APPs dynamics

2.5.1. Hydrodynamic transport

To estimate the transport of APPs in PL estuary, a time series of current measured at hourly intervals by a Sontek Doppler Current Profiler (ADP, 1.0 MHz) was used. The equipment was deployed by the center of the entrance channel at 15 m deep (Fig. 1). The longitudinal current velocity for each ADP cell was depth integrated according to Miranda et al. (2002). Data corresponding to a wet season/highest discharge period (from 31st October to 30th November 2005) and dry season/lowest discharge period (from 1st April to 31st May 2006) were analyzed for the present study. In spite of summer and autumn presenting approximately the same river discharge, data from Southern Hemisphere Autumn was chosen because this is the time of the year when the passage of cold fronts produce stronger SW winds, forcing salty water to propagate larger distances within the Lagoon (Möller and

Castaing, 1999). For each selected period, data of the longitudinal velocity current representing the effect associated to the passage of cold fronts over the area were separated. In this case, the situation started when the water began to flush into the Lagoon because of SW winds and finished when the cycle of the seaward flow, forced by NE winds, stopped. River discharge data from the main tributaries were obtained through the data bank of the Brazilian National Water Agency (hidroweb.ana.gov.br).

2.5.2. Settling velocity

A settling test combined with hydrodynamics data were used to estimate APPs dynamics in PL estuary. The settling velocity of APPs was measured in graduated cylinders (1 L) filled with artificial seawater with intermediate estuarine salinity (15). About 150 mg of each APPs sample (P1, P2, P3 and P4) were weighed, gently dumped in the top of graduate cylinders, and the time to reach the bottom (15 cm) was recorded. The position of APPs was visually registered at initial time (T0) and after 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h. The test was performed twice for each experimental condition (with and without agitation on an orbital desk at 30 rpm). Densities of each APPs sample used in the settling test were calculated by Monte Carlo Simulation test using Win Casino Software (V2 48, Quebec, Canada). The data obtained were expressed as the observed position of most APPs added inside the cylinder.

3. Results and Discussion

3.1. Potential sources of Antifouling Paint Particles

Results obtained from the questionnaires indicated the presence of ten sites around Patos Lagoon (PL) estuary with potential to generate antifouling paint particles (APPs) (Figure 1a and Table 1). These locations are (A) Barra Rio Grande fishing harbour; (B) Barra São José do Norte shipyard; (C) Santos shipyard; (D) Quatro Irmãos shipyard; (E) Alemão shipyard; (F) Irmãos Fernandes shipyard; (G) Yacht Club Rio Grande; (H) Bosque fishing harbour; (I) Ilha dos Marinheiros fishing harbour; (J) Ilha da Torotama fishing harbour.

Despite being the biggest within PL estuary, in Rio Grande shipyard are built only oil platforms that does not require routinely antifouling coatings (personal communication, Rio Grande shipyard). Table 1 describes each area identified by the survey as potential source of APPs and provides information about the respective main trademarks of antifouling paint used, methods for removal of antifouling coatings, boat size and frequency of maintenance, and how adequate is the residue disposal.

Considering the different trademarks of antifouling paints and methods used to remove old coatings, the APPs introduced in these areas are very heterogeneous in their composition, shape and size. This heterogeneity was already described by Singh & Turner (2009b) and Turner (2010) for APPs collected from a maintenance facility in England. The lack of control in the disposal of APPs generated during the maintenance procedures was detected in all studied sites. Thus, these areas act as important sources of APPs and, consequently, as sources of antifouling biocides and other compounds present in the paint formulation to the aquatic environment. In fact, whenever associated to APPs increases significantly the biocides half-life (Thomas et al., 2003), highlighting the importance of a suitable destination and management of these residues. Based on the frequency of boat maintenance and the amount of antifouling paints used in each source area, fishery harbours seemed to act as one of the main sources of APPs (Table 1 and Fig. 1a). A case study about the small-scale fisheries in the PL estuary, produced by the Food and Agriculture Organization (FAO), confirmed the presence of about 2,300 fishermen spread in 90 communities along the PL estuary shore. Moreover, the presence of boats is heterogeneous inside each community, since there are communities with 1 to 5 fishermen, while others have more than 100 fishermen (as those visited in this study) (Kalikoski and Vasconcellos, 2013). These data suggest that the cleaning process could be happening diffusely around the PL estuary shore.

In addition to fishing harbours, Santos shipyard, Rio Grande Yacht Club, Quatro Irmãos, Alemão shipyards and Irmãos Fernandes shipyard are locally inputting APPs to the PL. However, Irmãos Fernandes shipyard is out of operation since 2008 and without consumption of antifouling paints (Table 1).

3.2. Environmental Occurrence

3.2.1. Antifouling Paint Particles from sediment samples

The analysis performed in sediment samples from those 10 sites chosen as potential sources showed that seven sites (B, C, D, E, F, G, and H) presented APPs levels ranging from 0.001 to 44,300 $\mu\text{g g}^{-1}$. In addition, no APPs ($> 500 \mu\text{m}$) were detected in sediments from sites A, I and J, as well as in navigation channel of PL estuary (sites 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) (Figure 1b). Sediments collected nearby shipyards (B, C, D, E, F and G) showed the highest levels of contamination, while only one out of three fishing harbours (H) presented detectable levels of APPs. In Barra (A), Marinheiros (I) and Torotama (J) fishing harbours, the APPs amounts were $< \text{LOD}$, indicating that the cleaning of small fishery boats did not happen only in the fishery harbours, but rather diffused along estuarine shore. However, it is quite likely that levels of APPs have been underestimated due to the limitation associated to the technique used, which consider particles above 500 μm visually (or manually) screened under microscope. Thus, sites along the navigation channel and mainly those fishing harbours which showed undetectable levels, might have tiny undetectable fragments. The occurrence of high amounts of APPs in sediment reflect the lack of correct disposal of these residues besides environmental conditions of the area that will be discussed later.

3.2.2. Environmental occurrence of metals and booster biocides in sediments

All analyzed metals were detected in sediment samples (Table 2). Concerning the sediments from navigation channel (samples 1-9), the elements Cr, Cu, Mn, Sn and Zn

showed the highest levels, although Ni and Pb have presented levels near to the background for sediments from PL estuary (Niencheski et al., 2002). High concentration of Mn was found in sample 6, located near Barra de Pelotas (Fig 1). Cu was found in all samples with concentration ranging from 53.1 to 70.9 mg kg⁻¹. Zn was detected above the background level (87 ± 4.1 mg kg⁻¹ from Niencheski et al. (2002)) in four samples ranging from 86.5 (sample 3) to 119 mg kg⁻¹ (sample 4). Also, Sn was found in all sediment samples from navigation channel with high level in the sample 5 (267 ± 12 mg kg⁻¹). Regarding sediments collected in front of potential source areas (A to J), high concentrations of analyzed metals were also observed. High values of Cu were found in samples from boatyards and marinas (B, C, D, E, F and G). In addition, the highest values of Zn were found in sediments from boatyards B, F and G. Moreover, Pb was found at high concentration in sediments from the boatyards B and F, while high levels of Sn were found in sediments from boatyards C, F and G. Among other metals investigated, only Mn showed high concentration in samples from boatyards B, F and G. On the other hand, sediments from fishing harbours, did not show the presence of investigated metals above the background levels for PL estuary, except for samples from site H that showed high concentration of Pb (84.7 ± 3.2 mg kg⁻¹).

Some metals as Cu and Zn are often used as biocides in antifouling paints formulations (Almeida et al., 2007; Castro et al., 2011; Thomas and Brooks, 2010). Consequently, high levels of these metals were still found in APPs after paint removal (Singh and Turner, 2009b, Soroldoni et al. 2017). Cu and Zn levels found in sediments from navigation channel (samples 1-9, Table 2) suggest an increase of them in all samples. Although APPs were not found in these samples (Fig 1b), metals found in sediments obtained near to the boat maintenance areas (samples 1 and 3) may be consequence of APPs lower than 500 μ m not visualized by the method. However, even in boatyards these metals also may

came from other sources, such as boat traffic, oil waste and Zn sacrificial anodes used in boats to prevent corrosion (Costa and Wallner-Kersanach, 2013). High levels of Mn and Sn (Table 2) may be associated to fungicides such as Maneb and Brestan, which present these elements in their formulations, and have been used in rice and onion culture which are a very important economic resource for the region (Garcia, 2011). However, it is must noticed that Maneb also is used as biocide in antifouling paint formulation (Thomas and Brooks, 2010) and Sn may be present in APPs, evidencing the removal of old paint coating TBT-based (Singh and Turner, 2009b; Ytreberg et al., 2016). Furthermore, it should be stressed the difficulty of understanding and confirming the sources of investigated metals in estuarine sediments since different anthropogenic pathways may acting in this environment as boat traffic, agriculture sewage, domestic and industrial effluents (Wallner-Kersanacha et al., 2015).

Sediments from boat maintenance areas (B, C, D, E, F and G), showed high values of investigated metals, mainly Cr, Cu, Mn, Pb, Sn and Zn (Table 2). These results suggest that the presence of significant APPs amounts in these sediments (Fig. 1b) contribute to a metal enrichment in these places. In addition, boat traffic and moored boats also contribute to the leachate of these metals from antifouling coatings. Some studies support this hypothesis, detecting metal-enriched sediments close to boat maintenance facilities (Eklund et al., 2014; Takahashi et al., 2012; Turner, 2013).

In general, sediments from fishing harbours did not show metal contamination, that agree with the absence of APPs ($> 500 \mu\text{m}$). However, sample H showed high concentration of Pb (Table 2) in sediment. This contamination may be associated with APPs since this sample was the only one among fishing harbours that presents APPs in sediments (Fig 2b). As discussed before, cleaning process of small fishing boats is widespread along PL margins differing of boatyards and studied marina.

Regarding booster biocides (Table 2), DCOIT was the more frequent compound detected in sediment samples (1, 3, 8, C, F and G) followed by Irgarol 1051 (samples 7, F and G), Diuron (samples 7 and F) and TCMTB (sample 8). The marina near PL estuary (site G, Table 1) was the more impacted site showing $274 \pm 3 \text{ ng g}^{-1}$ of DCOIT in sediments in front of boat maintenance area. This result confirmed the direct relationship between APPs and DCOIT occurrence as previously showed by Soroldoni et al. (2017) in the same site (Table 3). This study also highlighted high acute and chronic toxicity of APPs to benthic organisms. Thus, the results of this study emphasize that APPs are a local and important source of antifouling biocides to estuarine sediments.

3.3. Chemical composition of APPs from boats

Four different APPs collected from boat maintenance areas have had their chemical composition investigated (Table 3). Among metals analyzed, high concentrations of Cu and Zn were found in all samples. In spite of being essential elements for many organisms, Cu and Zn may cause lethal and sub-lethal effects to some species at different life stages whenever concentrations are higher than physiologically necessary (Matthiessen et al., 1999). In addition, it must be pointed out the toxic effect resulting to the Cu-Zn mixture. A more than additive toxic effect was showed to *Daphnia magna* (Meyer et al., 2015) and *Pimephales promelas* after exposure to this binary mixture. Also, Pb was found in all APPs. This element has been used in primers which were applied on boat hulls before the antifouling paint, however, Costa et al. (2016) have identified Pb in different brands of antifouling paint used in Southern Brazilian boatyards. Lower concentrations of Mn, Ni and Cr were found in APPs and have also been reported in other studies as part of APPs composition (Singh and Turner, 2009b; Turner et al., 2009). In addition, high values of Sn were found in two APPs analyzed (P1 and P5, Table 3). According to Ytreberg et al. (2016) tin has never been added into paint formulations as an inorganic element. Thus, considering that TBT and TPT were extensively

used in paint formulations in the past (Yebera et al., 2004), these Sn levels may be related to coatings TBT-based. Considering the DCOIT levels detected in APPs, the results suggests this biocide as most used in antifouling paints in Southern Brazilian boat maintenance facilities. APP P5 showed the higher concentration of DCOIT in the analyzed sample, being consistent with the main antifouling paints used in this boatyard (Table 1). This compound was reported as the main booster biocide used in leisure boats (Harino et al., 2012). Although DCOIT has a fast degradation rate in aquatic environments, Thomas et al. (2003) suggested that APPs can produce a protective effect against its degradation being this compound still present in high concentrations and able to release in the aquatic system.

3.3.1. Scanning electron microscopy of APPs

Tables 4 and 5 summarizes the elemental composition of APPs, obtained by qualitative analysis using EDS technique, in boats and sediments, respectively. The qualitatively analyses of APPs from boats showed that C, Si, Fe, Al, Cu and Zn were the elements more representative in all analyzed samples. In EDS technique, the sample should be coated with a carbon film and its high amount in all samples may represent methodological influence. Silicon is used in the primer formulation as silica or silicone, as well as in binder systems, normally as silyl acrylate copolymer (Almeida et al., 2007). Other elements detected in the APPs, such as Cu and Zn, are usually used as biocides or organometallic co-biocides (e.g., Cu and Zn pyrithiones) in antifouling systems (Omae, 2003). Differences between relative distribution of elements occur probably due to the differences in paints formulations. Moreover, differences between EDS and ICP-OES techniques influence in some elements that were found during analytical determination, such as Pb and Sn that are not detected by EDS. X-rays from EDS technique has a penetration deep of 5 mm which limit the identification of elements on APPs (Goldstein et al., 2003). Thus, EDS prove to be useful for the first

screening of elements in APPs from sediments, since some samples were very small and with low amounts to perform a conventional analysis.

Regarding APPs from sediment, elements determination indicated that Si was the predominant element, although Ti, Al, Fe, S, Cu and Zn were also identified in all APPs analyzed (Table 5). These elements are frequently found in antifouling paints formulations and have different functions in these systems (Lambourne, 2000). Turner et al. (2008) analyzed the APPs composition by SEM-EDS, and have found high amount of Si and Ti in APPs collected from a leisure boat maintenance facility of Kingsbridge estuary, England. In Plym estuary (England), Singh and Turner (2009b) detected the occurrence of Si, Ca, Mg, Al, Fe, Ti, Cu and Zn in paint fragments from a large marine boat maintenance facility. Ti and Fe oxides are used mainly as pigments (Yebra et al., 2004) and Al in primers to provide non-slip proprieties (Almeida et al., 2007). In addition, metals detected in low percentage, such as Pb, has been used as pigment, drier and corrosion inhibitor (Lambourne, 2000). However, although there is an effort to phase-out all leaded paints (WHO, 2010), some countries have no restrictions on the use of Pb in any type of paints (Gottesfeld, 2015). Costa et al. (2016) analyzed different antifouling paint brands used in Southern Brazil boatyards and found significant concentrations of Pb (101.8 to 177.2 mg kg⁻¹).

Low content of Cu and Zn were detected in APPs retrieved from sediment. These levels might indicate that these metals used as biocidal, and found in high concentration in antifouling paints (Costa et al., 2016) and APPs (Table 3) may be less persistent in APPs than more insoluble pigments based on Ti and Al (Takahashi et al., 2012). In contrast, APPs from boats showed high relative concentration of Cu and Zn suggesting that these elements were continuous released from APPs in sediments. According to Fay et al. (2005) the water penetration in paint layer helps to release the molecules of the element. Moreover, high dissolution of toxic elements (Pb, Zn, and Cu) also confirms that APPs can act as a direct

source of these elements to water column and sediments. Thus, these results are of great environmental relevance since several studies suggest toxic effects on marine organisms caused by direct or indirect exposure to antifouling paint particles (Eklund et al., 2014; Gammon et al., 2009; Tolhurst et al., 2007; Turner and Hambling, 2012, Soroldoni et al., 2017).

3.4. Environmental dynamics of APPs

3.4.1. *Settling speed and aquatic transport*

The Settling test performed using APPs from four different commercial coatings (P1, P2, P3 and P4, as described above) indicated that particle size, density, and stirring affect the settling velocity. Density seems to affect only particles bigger than 1 mm with and without stirring conditions, since the densest particle settle faster than the least dense ones (P1 = 3.11; P4 = 2.77; P3 = 2.52 and P2 = 2.33 g cm⁻³) (Figure 2a and 2c). The exception was APPs P2 that does not settle even after 24 h, therefore some particularity in APP P2 composition may be responsible for its different behavior in settling test. These epoxy-based particles showed a hydrophobic behavior. Results from EDS showed high relative percentage of Si and P suggesting that this Si/P epoxy coating may influence its dynamics in water. On the other hand, settling velocity for particles < 180 μm without stirring had little influence of the density, since most of APPs (P1, P2, P3 and P4) remained in the top of the cylinder after 24 h (Figure 3b). The agitation has, apparently, helped to break the water superficial tension for APPs below 180 μm, which settle with a certain relationship between particle density (P1 = 2.23; P2= 2.33; P3 = 2.12 and P4 = 2.21 g cm³) and settling velocity (Figure 2d).

Since each boat maintenance facility is likely to produce particles with different composition, size and shape, the present data on settling velocity also indicate that APPs presents heterogeneous behaviors in the aquatic system. Then, a couple of hours could be enough to transport the APPs and produce contamination in areas far from their sources.

Since in the aquatic environment the agitation is always present, in natural environments APPs > 1 mm could have the same behavior that APPs < 180 μm , that will be more transported.

APPs generated around PL estuary are subject to different hydrodynamic scenarios, such as high and low river discharge. Besides that, as already mentioned above, in laboratory experiments, most part of APPs remained in suspension or even lead 24 h or more to reach a depth of 0.15 m, being easily influenced by PL hydrodynamic. Considering that transport analysis was performed with the average velocities of the two meters deep in PL estuary, in a high discharge period (between 4th October of 2005 to 15th October of 2005), with an average velocity of -0.63 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, APPs probably moved (in 24 h in suspension in water column) approximately 58 km towards the mouth of the estuary. Since some areas that produce APPs are located in the access channel, probably in 10 h they would be out of the mouth of PL. On the other hand, during low discharge period (between 1st April of 2006 to 31st May of 2006), in flood periods, with velocities of $+0.48$ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, APPs would be dislocated to inner estuary of 41 km in 24 h. Therefore, in periods of low discharge, these APPs would reach large areas within estuarine area of PL, having a longer permanence time, especially when compared with high discharge periods. This can be explained mainly by the residence time of PL, calculated by Moller et al. (1996). For high discharge periods (October to November with a freshwater discharge about $3,000$ m^3 s^{-1}) the residence time would be 5 days and for low discharge periods (April to May, with a freshwater discharge about 340 m^3 s^{-1}) the residence time increase to 51 days. Therefore, the main difference in these scenarios is the freshwater discharge. In high discharge periods, only strongest S/SW winds can reverse ebb fluxes that control all water column. The estuary act as a river where particles and substances are quickly transported to coastal zone. Sites A, C, D and E, considered as sources of APPs, would be

under this regime (Fig 1b) resulting in low amounts of APPs in sediment, as showed. In low river discharge periods, the currents are reversed during SW wind events and particles can stay for a long time in the estuary or can even reach inner parts of the Lagoon. Because of the high turbulence level in this area driven by strong currents, the settlement of particles is difficult to occur since their vertical velocity is very small. On the other hand, in more protected areas, such as sites B, F and G (Fig. 1b), where the dynamics is very low, deposition may occur causing sediment contamination. Also, the transport of APPs from these sources to PL channel may happen in a very slow rate, as observed in the lack of APPs bigger than 500 μm in sediments collect in PL channel (Table 2, samples 1 to 9).

3.5. Environmental implications

This study presents the first results about the environmental issue related with antifouling paint particles (APPs) in Latin America coastal areas. Ten areas around Patos Lagoon (PL) estuary were identified as sources of APPs to the environment. In addition, the use of different paint brands and a variety of removal methods affects composition, shape, density and size of APPs. Although fishery harbours were considered among the largest APPs generators in this study, these sources seem to be diffuse around PL estuary, adding greater heterogeneity in the APPs distribution. This fact highlights that APPs occurrence are related to the hydrodynamics of the estuarine area. On the other hand, results indicated that APPs generated by ship/boat yards and the marina around PL estuary are being discarded in the estuarine environment, since high levels of APPs were detected in sediment samples near these sites. Moreover, APPs composition showed the presence of metals and booster biocides used in antifouling paints, indicating that APPs represent a significant and localized source of these hazardous substances to aquatic environment impacted by boating maintenance activities. DCOIT was the booster biocide detected at higher levels in APPs from Southern Brazilian boatyards, and once APPs act as a continuous source of DCOIT causing acute and

chronic toxicity in benthic organisms (Soroldoni et al. 2017), the importance of regulation covering the presence of these compounds in antifouling residues and its correct disposal needs to be highlighted. In addition, the presence of APPs in sediments pointed out the environmental relevance of APPs contamination since organic and metallic biocides persist in these residues, creating “hot spots” of contamination as observed in the marina (site G, Table 1). Laboratory experiments indicated that water stirring, size, density and shape of APPs may affect APPs mobility. Therefore, in front of boat maintenance facilities, stronger current velocities may accelerate APPs mobility transporting these residues to other areas of the PL or adjacent coastal zone (ebb conditions). The lack of big APPs ($> 500 \mu\text{m}$) in sediments from the PL channel, may reduce the dispersion of these APPs or their fragmentation in smaller pieces, which are impossible to analyze with the proposed methodology. The dispersion of APPs in the PL estuary increases the relevance of the problem for the entire estuarine environment and coastal zone. Even though the dispersion of APPs may decrease concentration and release of toxic compounds, these particles can reach areas far from their source. This is particularly important in the case of Irmãos Fernandes shipyard (Site F, Table 1) that even 8 years out of service, showed high levels of APPs in its sediments that has been received APPs for about 100 years. In conclusion, APPs may be considered an environment problem in Southern Brazilian estuarine area, since these residues have been overlooked in these areas and specific regulations need to be improved. Despite the lack of studies for other Brazilian coastal areas, the absence of both legislation and control suggest that this scenario is the same in other areas under the presence of fishing harbours and small and medium-sized boat maintenance facilities. Else more, APPs were found in estuarine sediments acting as a local source of metals and booster biocides in concentration able to cause deleterious effect on estuarine biota (Soroldoni et al., 2017).

Acknowledgments

S. Soroldoni and F. E. Abreu are PhD candidates at Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG) sponsored by CAPES. This research was supported by CNPq (Project 481267/2013-1) and FINEP (Project N° 1111/13 (01.14.0141.00)). I.B. Castro was sponsored by CNPq (PQ 306486/2015-6). G. Fillmann was sponsored by CNPq (PQ 312341/2013-0). We wish to thank CEMESUL – FURG for SEM-EDS analyses. We also thanks YCRG and Santos boatyard for supplying the APPs samples. Special thanks to Samantha Vieira da Silva and Rodrigo Moço Batista for help in sediment samples collection.

4. References

- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings*. Doi:10.1016/j.porgcoat.2007.01.017
- Castro, Í.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. *Quim. Nova*. Doi:10.1590/S0100-40422011000600020
- Champ, M.A., 2003. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Mar. Pollut. Bull.* Doi:10.1016/S0025-326X(03)00106-1
- Costa, L.F.D., Mirlean, N., Wasserman, J.C., Wallner-Kersanach, M., 2016. Variability of labile metals in estuarine sediments in areas under the influence of antifouling paints , southern Brazil. *Environ. Earth Sci.* Doi:10.1007/s12665-016-5355-5
- Costa, L.F.D., Wallner-Kersanach, M., 2013. Assessment of the labile fractions of copper and zinc in marinas and port areas in Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 6767–6781. Doi:10.1007/s10661-013-3063-0

- Eklund, B., Johansson, L., Ytreberg, E., 2014. Contamination of a boatyard for maintenance of pleasure boats. *J Soils Sediments*. Doi:10.1007/s11368-013-0828-6
- Fay, F., Linossier, I., Langlois, V., Haras, D., Vallee-Rehel, K., 2005. SEM and EDX analysis: Two powerful techniques for the study of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings*. Doi:10.1016/j.porgcoat.2005.05.005
- Fernandes, E.H.L., Dyer, K.R., Moller, O.O., Niencheski, L.F.H., 2002. The Patos Lagoon hydrodynamics during an El Niño event (1998). *Cont. Shelf. Res.* 22, 1699–1713
- Gammon, M., Turner, A., Brown, M.T., 2009. Accumulation of Cu and Zn in discarded antifouling paint particles by the marine gastropod, *Littorina littorea*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* doi:10.1016/j.ecss.2009.07.009
- Garcia, J. G. 2011. Acumulação de elementos traço em organismos no estuário da Lagoa dos Patos. M.Sc Dissertation. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 105 p.
- Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Third ed., Springer Science + Business Media New York, p. 689.
- Gottesfeld, P., 2015. Time to ban lead in industrial paints and coatings. *Front Public Health*. 3, 144. doi 10.3389/fpubh.2015.00144
- Harino, H., Arifin, Z., Rumengan, I.F.M., Arai, T., Ohji, M., Miyazaki, N., 2012. Distribution of antifouling biocides and perfluoroalkyl compounds in sediments from selected locations in Indonesian coastal waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 13–21. doi:10.1007/s00244-011-9747-y
- Harris, J.R.W., Hamlin, C.C., Stebbing, A.R.D., 1991. A simulation study of the effectiveness of legislation and improved Dockyard practice in reducing TBT concentrations in the Tamar Estuary. *Mar. Environ. Res.* doi:10.1016/0141-1136(91)90049-E
- Hasan, C.K., Turner, A., Readman, J., Frickers, T., 2014. Environmental Risks Associated

- with Booster Biocides Leaching from Spent Anti-Fouling Paint Particles in Coastal Environments. *Water Environ. Res.* 86, 2330–2337. doi:10.2175/106143014X14062131178835
- IMO, 2008. Summary of the status of convention as at 31 May 2007. International Marine Organization, United Kingdom, <http://www.imo.org>
- Kalikoski, D.C., Vasconcellos, M., 2013. Estudo das condições técnicas, econômicas e ambientais da pesca de pequena escala no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil: Uma metodologia de avaliação. FAO, Circular de Pesca e Aquicultura n. 1075. Roma, FAO, 200 pp.
- Kjerfve, B. 1986. Comparative oceanography of coastal lagoons, p. 63–81. In D. A. Wolfe (ed.), *Estuarine Variability*. Academic Press, New York.
- Kotrikla, A., 2009. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *J. Environ. Manage.* 90, S77–S85.
- Lambourne, R., 2000. The painting of ships, in: Lambourne, R., Strivens, T. (Eds.), *Paint and Surface Coatings: Theory and Practice*. William Andrew Publishing, England, pp. 529–549.
- Meyer, J.O.S., RAnville, J.A.F., POntasch, M.A., GOrsuch, J.O.W., ADams, W.I.J., 2015. Metal Mixture Modeling Evaluation Cd , Cu , AND Zn To *Daphnia magna* 34, 799–808. doi:10.1002/etc.2787
- Miranda, L. B., Castro, B. M., Kjerfve, B., 2002. *Princípios de oceanografia física de estuários*. EDUSP, São Paulo, 414 pp
- Moller, O.O., Castaing, P., Salomon, J.-C., Lazure, P., 2001. The Influence of Local and Non-local Forcing Effects on the Subtidal Circulation of Patos Lagoon. *Estuaries* 275–289
- Moller, O.O., Lorenzzenti, J. a., Stech, J., Math, M.M., 1996. The Patos Lagoon summertime circulation and dynamics. *Cont. Shelf Res.* 16, 335–351. doi:10.1016/0278-

4343(95)00014-R

- Moller, O.O., Castaing, P., 1999. Hydrographical characteristics of the estuarine area of Patos Lagoon (30°S, Brazil), p. 83–100. In Perillo, G. M., Piccolo, M. C., Pino-Quivira, M. (eds.), *Estuaries of South America: Their Geomorphology and Dynamics*. Springer Verlag, Berlin.
- Niencheski, L.F.H., Baraj, B., Franca, R.G., Mirlean, N., 2002. Lithium as a normalizer for the assessment of anthropogenic metal contamination of sediments of the southern area of Patos Lagoon. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 5, 473–483. doi:10.1080/14634980290001977
- Omae, I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives 81–105. doi:10.1002/aoc.396
- Okamura, H., Mieno, H., 2006. Present status of antifouling systems in Japan: Tributyltin substitutes in Japan, in: Konstantinou, I. (Eds.), *The handbook of environmental chemistry*. Springer, Berlin, pp. 201-212.
- Singh, N., Turner, A., 2009a. Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2008.10.003
- Singh, N., Turner, A., 2009b. Trace metals in antifouling paint particles and their heterogeneous contamination of coastal sediments. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2008.11.014
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, I. B., Duarte, F.A., Pinho, G. L. L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?. *J. Haz. Mat.* doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.001
- Takahashi, C.K., Turner, A., Millward, G.E., Glegg, G.A., 2012. Persistence and metallic composition of paint particles in sediments from a tidal inlet. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2011.10.010

- Thomas, K. V., McHugh, M., Hilton, M., Waldock, M., 2003. Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/S0269-7491(02)00343-3
- Thomas, K. V, Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*. doi:10.1080/08927010903216564
- Tolhurst, L.E., Barry, J., Dyer, R.A., Thomas, K. V., 2007. The effect of resuspending sediment contaminated with antifouling paint particles containing Irgarol 1051 on the marine macrophyte *Ulva intestinalis*. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.005
- Turner, A., 2013. Metal contamination of soils, sediments and dusts in the vicinity of marine leisure boat maintenance facilities. *J. Soils Sediments*. doi:10.1007/s11368-013-0686-2
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Turner, A., Fitzer, S., Glegg, G.A., 2008. Impacts of boat paint chips on the distribution and availability of copper in an English ria. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2007.02.007
- Turner, A., Hambling, J., 2012. Bioaccessibility of trace metals in sediment, macroalga and antifouling paint to the wild mute swan, *Cygnus olor*. *Water. Air. Soil Pollut.* doi:10.1007/s11270-011-1043-y
- Turner, A., Singh, N., Richards, J.P., 2009. Bioaccessibility of metals in soils and dusts contaminated by marine antifouling paint particles. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2009.01.008
- Wallner-Kersanacha, M., Mirlean, N., Baumgarten, M. da G.Z., Costa, L.D.F., Baisch, P., 2015. Temporal evolution of the contamination in the southern area of the Patos Lagoon estuary, RS, Brazil. *Rev. Gestão Costeira Integr.* 16, 263–279. doi:10.5894/rgci596

World Health Organization. Global Alliance to Eliminate Lead Paint [Internet]. Available from: http://www.who.int/ifcs/documents/standingcommittee/working_groups/linp_iccm_2res.pdf

Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coatings*. doi:10.1016/j.porgcoat.2003.06.001

Ytreberg, E., Bighiu, M.A., Lundgren, L., Eklund, B., 2016. XRF measurements of tin, copper and zinc in antifouling paints coated on leisure boats. *Environ. Pollut.* 213, 594–599. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.029

Table 1: Sites identified as potential source of APPs within Patos Lagoon (PL) estuary with their respective associated activities, antifouling paints trademarks used, methods used to remove antifouling coatings, maintenance frequency, boat size and disposal of generated APPs.

Site	Main associated activities	Main antifouling paint trademark used	Main method used to remove coatings	Frequency of maintenance	Boat size	Disposal of APPs
Barra Rio Grande fishermen harbour (A)	Fishery harbour, located near the PL mouth.	Tritão (International®)	Scrapping and sanding	Once a year	3 to 9 m	Not adequate
Barra São José do Norte shipyard (B)	Shipyard near the PL mouth, in a protected area. At least 20 years of activity.	Tritão (International®)	Scrapping and sanding	1 to 2 boats per month	3 to 12 m	Not adequate
Santos shipyard (C)	Shipyard near Rio Grande Harbour. 60 years of activity.	Supermarine AF Ionex (Renner®) W Marine plus 100 (Weg)	Scrapping and blasting water	4 boats per month	10 to 27 m	Not adequate
4 Irmãos shipyard (D)	Shipyard located in São José do Norte city. At least 20 years of activity.	Supermarine AF Ionex (Renner®) and Microm Premium (International®)	Scrapping and blasting water	2 to 3 boats per month	10 to 27 m	Not adequate
Alemão shipyard (E)	Shipyard located in São José do Norte city. At least 20 years of activity.	Supermarine AF Ionex (Renner®) and Microm Premium (International®)	Scrapping and blasting water	2 to 3 boats per month	10 to 27 m	Not adequate
Irmãos Fernandes shipyard (F)	Shipyard located in Porto Velho region. More than 100 years of activity, but out of service since 2008.	-	-	-	10 to 27 m	Not adequate
Rio Grande Yacht Club (G)	Mooring area for leisure boats. 25 years of activity	Microm Premium and Tritão (International®)	Scrapping and blasting water	4 boats per month	10 to 27 m	Not adequate
Bosque fishermen harbour (H)	Fish harbour located far from navigation channel of PL.	Tritão (International®)	Scrapping and sanding	Once a year	3 to 12 m	Not adequate
Marinheiros fishermen harbour (I)	Fish harbour located near Ilha dos Marinheiros island.	Tritão (International®)	Scrapping and sanding	Once a year	3 to 12 m	Not adequate
Torotama fishermen harbour (J)	Fish harbour in the central part of PL estuary.	Tritão (International®)	Scrapping and sanding	Once a year	3 to 12 m	Not adequate

Table 2. Concentration of metals (mg kg⁻¹) and booster biocides (ng g⁻¹) in sediments samples. Results were expressed as mean ± standard deviation. Samples 1 to 9 are from navigation channel and A to I from source areas (Fig.1).

Samples	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Sn	Zn	Diuron	Irgarol 1051	TCMTB	DCOIT
1	34.2 ± 1.1	53.1 ± 1.8	631 ± 5	8.90 ± 0.96	19.3 ± 11.6	25.6 ± 19.9	61.0 ± 1.5	Nd	Nd	Nd	1.27 ± 0.20
2	36.6 ± 3.5	68.6 ± 5.8	267 ± 27	10.5 ± 2.9	18.6 ± 2.9	26.1 ± 1.3	82.2 ± 9.4	Nd	LOD	Nd	Nd
3	44.6 ± 0.8	59.1 ± 3.3	787 ± 153	14.7 ± 0.4	22.4 ± 1.9	14.5 ± 0.5	86.5 ± 1.6	Nd	Nd	Nd	1.40 ± 0.50
4	49.7 ± 0.8	60.4 ± 0.8	924 ± 6	18.6 ± 0.1	27.9 ± 5.2	28.3 ± 11.3	119 ± 2	Nd	Nd	Nd	Nd
5	26.6 ± 1.4	57.8 ± 0.6	405 ± 31	< 2.57*	21.2 ± 0.49	267 ± 115	57.3 ± 2.64	Nd	Nd	Nd	Nd
6	52.2 ± 1.4	61.4 ± 1.5	1099 ± 13	18.8 ± 0.7	22.9 ± 1.50	28.8 ± 7.29	95.6 ± 0.31	LOQ	Nd	Nd	Nd
7	37.9 ± 0.3	66.5 ± 2.6	357 ± 4	11.4 ± 0.7	16.7 ± 1.3	49.0 ± 3.4	89.3 ± 0.9	LOQ	Nd	Nd	Nd
8	31.5 ± 1.9	70.9 ± 5.2	391 ± 16	8.03 ± 0.54	13.1 ± 1.9	54.3 ± 20.3	75.9 ± 5.6	LOQ	LOQ	2.63 ± 0.10	2.92 ± 0.10
9	25.4 ± 0.54	55.4 ± 0.8	270 ± 6	< 2.57*	12.4 ± 6.6	27.0 ± 1.8	47.8 ± 0.7	1.56 ± 0.11	3.68 ± 0.8	Nd	Nd
A	1.31 ± 0.37	6.17 ± 0.20	13.9 ± 0.75	< 2.57*	< 7.58*	4.51 ± 0.42	3.81 ± 0.58	LOD	LOD	Nd	LOQ

B	30.6 ± 1.9	77.7 ± 2.6	198 ± 3	< 2.57*	118 ± 8	16.9 ± 7.7	124 ± 1	LOQ	Nd	LOQ	LOQ
C	10.6 ± 1.6	60.4 ± 18.9	140 ± 32	< 2.57*	< 7.58*	38.5 ± 23.5	65.3 ± 20.0	Nd	Nd	Nd	3.73 ± 0.9
D	43.7 ± 16.3	91.4 ± 15.1	31.6 ± 2.0	4.05 ± 1.01	9.80 ± 1.58	11.3 ± 0.2	88.8 ± 35.5	Nd	Nd	Nd	LOQ
E	4.63 ± 0.56	40.8 ± 19.2	451 ± 1.9	< 2.57*	11.8 ± 4.9	7.90 ± 4.45	27.8 ± 6.8	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
F	45.6 ± 0.7	40.7 ± 1.3	640 ± 29	16.8 ± 0.6	26.5 ± 1.8	34.5 ± 0.9	93.9 ± 1.2	7.7 ± 3.6	17.75 ± 0.4	Nd	6.21 ± 0.4
G	29.5 ± 4.2	184 ± 62	206 ± 11	7.84 ± 5.35	16.8 ± 1.8	63.6 ± 37.8	119 ± 8	LOQ	4.9 ± 0.2	LOQ	273.73 ± 3.1
H	2.04 ± 0.50	8.70 ± 5.10	20.9 ± 1.47	< 2.57*	84.7 ± 3.2	15.1 ± 0.5	12.3 ± 1.0	LOD	LOD	Nd	Nd
I	1.14 ± 0.64	< 4.19*	12.0 ± 2.6	< 2.57*	< 7.58*	9.56 ± 1.07	4.13 ± 0.01	LOD	LOD	Nd	Nd
J	4.90 ± 2.56	< 4.19*	24.0 ± 1.1	< 2.57*	< 7.58*	11.5 ± 2.7	5.88 ± 1.50	Nd	LOD	Nd	Nd
LOQ*	1.00	4.19	0.114	2.57	7.58	7.82	0.63	0.5	0.5	0.5	1.5

Table 3. Concentration of metals (kg g⁻¹) and booster biocides (ng g⁻¹) in APPs from boats samples collected in two different boat maintenance facilities (Table 1), site C – Santos shipyard and site G - YCRG. Results are expressed as mean ± standard deviation.

Sample / Source	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Sn	Zn	Diuron	Irgarol 1051	TCMTB	DCOIT
P 1 Shipyard (C)	68.6 ± 18.2	178,471 ± 6448	232 ± 6	141 ± 8	421 ± 12	880 ± 42	108,190 ± 2409	25.34 ± 5.64	3.20 ± 0.43	n.d	88.63 ± 7.49
P 3 Marina (G)	47.3 ± 1.2	139,685 ± 136	38.8 ± 1.5	66.5 ± 2.6	310 ± 7	n.a	24,567 ± 285	n.d	LOQ	n.d	LoQ
P 4 Marina* (G)	67 ± 1	234,247 ± 268	56 ± 0	223 ± 4	512 ± 6	n.a	112,404 ± 845	LoQ	LoQ	n.d	134 ± 30
P 5 Shipyard (C)	159 ± 51	286,579 ± 2563	231 ± 1	170 ± 23	546 ± 10	589 ± 23	116,043 ± 815	n.d	n.d	n.d	67,125.1 ± 2,386.7

* Results from Soroldoni et al. (2017).

Table 4: Relative percentage from EDS analyses of elements present in APPs collect from boats in two different boat maintenance facilities (Table 1), site C – Santos shipyard and site G - YCRG.

Samples / Source	C	Mg	Mn	Al	Si	P	S	Cl	Ti	Fe	Ca	Cu	Zn	Sn	Pb	Ba	K
P1 Shipyard (C)	30.51	0.56	Nd	5.70	13.48	0.51	16.40	0.46	Nd	2.50	0.43	18.34	11.11	Nd	Nd	Nd	Nd
P2 Shipyard (C)	33.28	0.56	Nd	9.99	16.73	19.04	Nd	0.53	Nd	15.58	0.41	Nd	Nd	Nd	Nd	1.48	Nd
P3 Marina (G)	19.96	2.72	Nd	2.97	6.21	Nd	3.91	Nd	Nd	32.90	3.36	21.94	5.86	Nd	Nd	Nd	0.18
P4 Marina (G)	4.89	Nd	0.09	Nd	12.93	Nd	Nd	Nd	42.89	0.84	Na	20.30	8.65	1.19	0.68	Nd	nd
P5 Shipyard (C)	21.45	2.37	Nd	5.77	18.86	0.98	1.29	5.14	0.54	10.38	11.06	11.59	10.59	Nd	Nd	Nd	Nd

Table 5: Relative percentage of elements present in APPs obtained from sediments collected nearby five shipyards (B – Barra São José do Norte shipyard; C - Santos shipyard; D - Alemão shipyard; E - 4 Irmãos shipyard; F – Irmãos Fernandes shipyard, and G - Rio Grande Yacht Club) located at PL estuary.

	B (n=3)	C (n=5)	D (n=7)	E (n=5)	F (n=4)	G (n=3)
Ca	Nd	4.85*	Nd	Md: 1.96 Min: 1.17 Max: 2.66	Md: 1.90 Min: nd Max: 2.60	Nd
Mg	Md:2.73 Min: 2.50 Max: 2.97	4.95*	Nd	Md: 1.33 Min: Nd Max: 1.53	1.53*	Nd
Na	Md: 3.06 Min: 2.93 Max: 3.19	1.85*	Nd	Md: 0.64 Min: Nd Max: 1.53	Md: 1.08 Min:0.64 Max:1.53	Nd
Al	Md: 18.48 Min:18.23 Max: 18.73	Md: 15.89 Min: 14.34 Max: 18.69	Md: 18.18 Min: 12.61 Max: 21.70	Md: 7.0 Min: 4.68 Max: 8.89	Md: 6.90 Min: 4.68 Max: 8.89	Md: 16.09 Min: 15.69 Max: 16.77
Si	Md: 54.08 Min: 53.86 Max: 54.30	Md: 50.11 Min: 46.99 Max: 53.71	Md: 49.78 Min: 39.18 Max: 59.21	Md: 14.03 Min: 8.23 Max: 19.55	Md: 14.94 Min: 10.45 Max: 19.55	Md: 52.49 Min: 49.23 Max: 55.12
Ti	Md: 5.40 Min: 4.15 Max: 6.66	Md: 4.17 Min: 0.93 Max: 11.89	Md: 3.09 Min: 0.66 Max: 10,93	Md: 2.51 Min: Nd Max: 8.55	Md: 3.09 Min: 0.36 Max: 8.55	Md: 4.27 Min: 3.59 Max: 5.54
Cr	3.20*	1.64*	5.89*	Md: 0.24 Min: Nd Max: 0.76	Nd	Nd
P	Nd	Nd	8.08*	Md: 0.96 Min: 0.56 Max: 1.72	Md: 1.28 Min: 0.85 Max: 1.72	Nd
S	Md: 3.64 Min: Nd Max: 3.67	Md: 9.01 Min: 6.44 Max: 9.95	Md: 4.12 Min: 1.71 Max: 9.58	Md: 0.49 Min: Nd Max: 1.57	0.49*	Md: 6.91 Min: 6.16 Max: 8.29
Fe	Md: 11.32 Min: 10.77 Max: 11.87	Md: 13.69 Min: 10.84 Max: 18.17	Md: 17.92 Min: 9.13 Max: 27.03	Md: 34.62 Min: 27.81 Max: 53.85	Md: 36.65 Min: 27.81 Max: 53.85	Md: 19.38 Min: 18.57 Max: 20.38
Pb	Nd	4.89*	22.47*	1.09*	Nd	Nd
Sn	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Cu	0.07*	Md: 4.98 Min: 0.33 Max: 10.90	Md: 1.90 Min: 0.19 Max: 5.60	Md: 1.41 Min: 0.72 Max: 6.95	Md: 2.68 Min: 0.72 Max: 6.95	Md: 0.27 Min: 0.12 Max: 0.36
Zn	2.03*	Md: 1.06 Min: 0.35 Max: 1.99	Md: 0.75 Min: 0.15 Max: 1.98	Md: 1.71 Min: 0.52 Max: 3.76	Md: 1.96 Min: 0.52 Max: 3.40	Md: 0.57 Min: 0.38 Max: 0.84

Note: n refers to the number of fragments analyzed in each area.

Nd: denotes that the element was not detected in any sample of this source area.

Md: median, Min: minimum, Max: maximum.

* The element was detected in only one sample among the pool

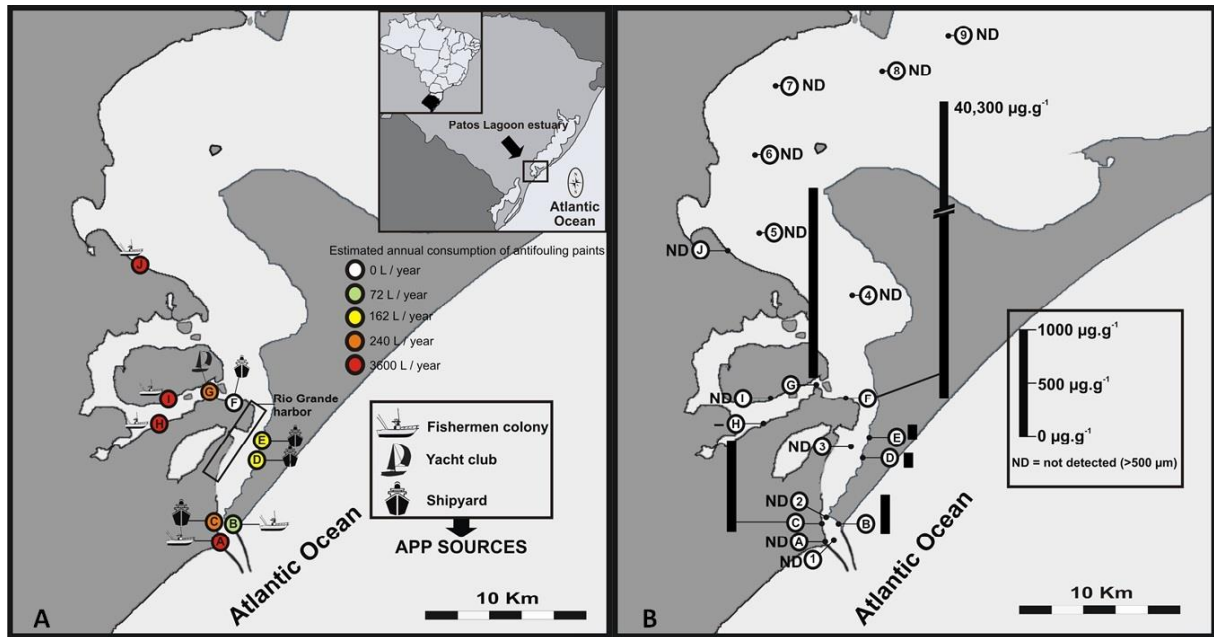


Figure 1: Sources (A) and occurrence of antifouling paint particles in sediments (B). The numbers 1 to 9 indicate the sediment samples collected along the estuarine channel.

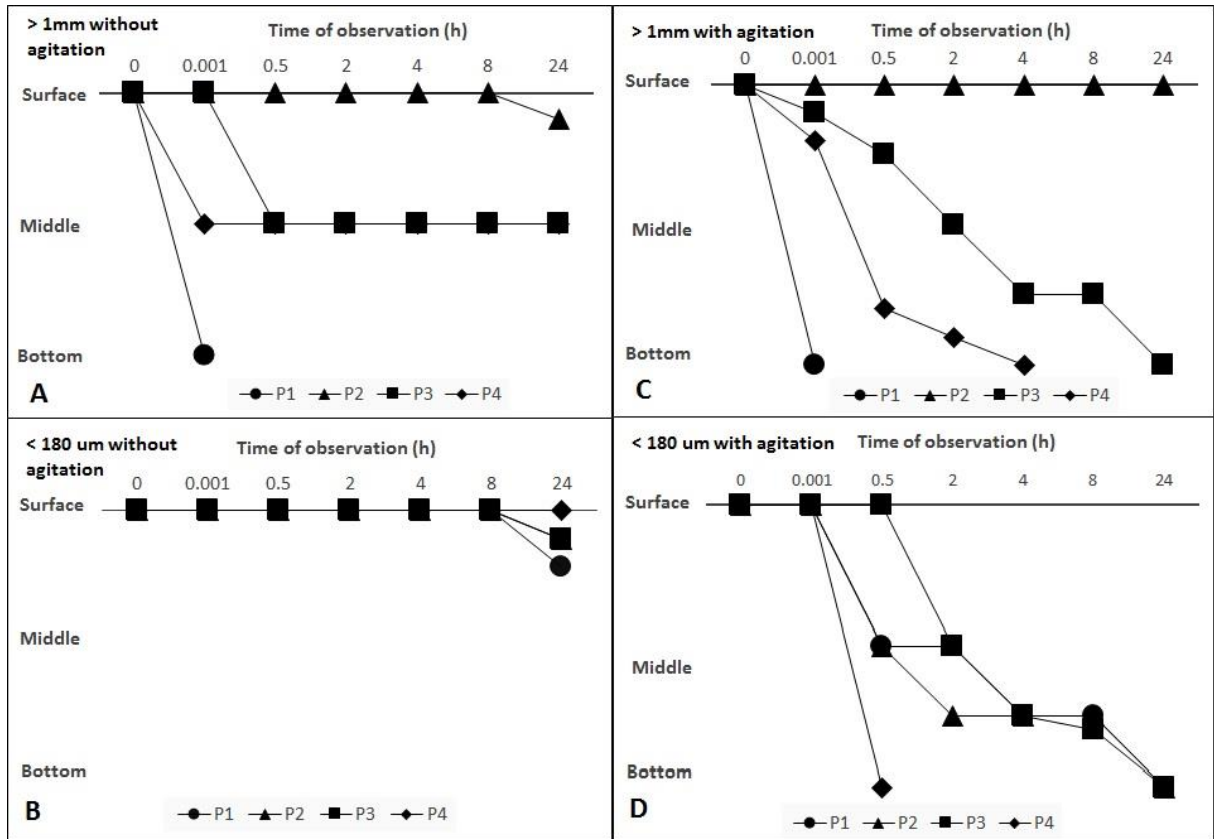


Figure 2: Settling speed experiment with APPs P1, P2, P3 and P4 of different sizes and without and under agitation. The y-axis represents the median position of APPs in the cylinder.

Accepted Manuscript

Title: Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?

Authors: Sanye Soroldoni, Fiamma Abreu, Ítalo Braga Castro, Fabio Andrei Duarte, Grasiela Lopes Leães Pinho



PII: S0304-3894(17)30082-1
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>
Reference: HAZMAT 18356

To appear in: *Journal of Hazardous Materials*

Received date: 10-11-2016
Revised date: 30-1-2017
Accepted date: 1-2-2017

Please cite this article as: Sanye Soroldoni, Fiamma Abreu, Ítalo Braga Castro, Fabio Andrei Duarte, Grasiela Lopes Leães Pinho, Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?, *Journal of Hazardous Materials* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.001>

Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment?

Sanye Soroldoni¹, Fiamma Abreu¹, Ítalo Braga Castro², Fabio Andrei Duarte³,
Grasiela Lopes Leães Pinho¹

1-Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (IO -FURG). Av. Itália s/n, Campus Carreiros, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

2- Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo (IMAR-UNIFESP). Av. Almirante Saldanha da Gama, 11030400, Santos, SP, Brazil

3- Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, 1000, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Email of corresponding author: grasielapinho@hotmail.com

ABSTRACT

Antifouling paint particles (APPs) are generated during periodical maintenance of boat hulls. Chemical composition and toxicity (either chronic or acute) of APPs found in the sediment was evaluated using the epibenthic copepod *Nitokra sp.* The APPs analyzed showed the presence of high levels of metals such as Cu ($234,247 \pm 268 \mu\text{g g}^{-1}$), Zn ($112,404 \pm 845 \mu\text{g g}^{-1}$) and the booster biocide DCOIT ($0.13 \mu\text{g g}^{-1}$). Even at low concentrations (as from 5 mg g^{-1} of APPs by mass of sediment) a significantly decrease in the fecundity was observed in laboratory tests. When the sediment was disturbed in elutriate test, a LC_{50} of 0.14% for APPs was found. This study was the first assessment of toxicity associated with the presence of APPs in sediment to benthic organisms, and it calls attention to the need of improving regulations in boatyards and marina areas.

Keywords: Antifouling paint particles, Boatyards, Booster Biocides, DCOIT, Metals, *Nitokra sp.*

1. Introduction

Antifouling paints are applied as protective coatings on ship and boat hulls to avoid the fouling settlement by marine organisms and to prevent various navigational problems. Fuel consumption, corrosion rates and the frequency of dry-docking operations are increased in the absence of these antifouling systems, thereby increasing the cost of maritime transport [1]. A global ban of tributyltin-based antifouling paints issued by the International Maritime Organization in 2008 [2], lead to the use of several chemical compounds in commercial antifouling paints, including booster biocides added to copper and/or zinc [3]. Currently, around 23 compounds, including Irgarol 1051, Diuron, Chlorotalonil, Dichlofuanid, TCMTB ((1,3-Benzothiazol-2-ylsulfanyl) methyl thiocyanate) and DCOIT (4,5-Dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one), are used as antifouling biocides [4,5]. The occurrence of biocides in the environment is systematically reported [6,7,8,9,10], however, few studies have investigated the toxicity of antifouling biocides on aquatic biota using single [11,12] or combined [13, 14, 15, 16, 17] exposure treatments for some of these compounds under laboratory conditions.

The impacts of antifouling paint particles (APPs), which are generated during repair, cleaning and painting procedures of vessel hulls [18, 19] are still largely unknown. These APPs are usually generated in boatyards, shipyards and marinas [20, 21] and can be transported and deposited in the sediment layers after their environmental inputs [22]. Contamination from APPs may present highly heterogeneous compositions depending on various factors, including paint application layers, removal process and deposition time [23]. Recent studies have identified these particles as a secondary source of metals such as copper, zinc and lead [21, 22, 23, 24, 25] beyond booster biocides [26, 27].

Although surface sediments represent the preferential deposition compartment for APPs in aquatic systems [22,23], no studies have so far investigated the potential risk of these residues on benthic species. Thus, the present study aimed to identify the composition of APPs collected in a marina, and to investigate the chronic and acute toxicity of these compounds to the epibenthic organisms via sediment bioassays.

2. Materials and Methods

2.1 Antifouling paint particles

Antifouling paint particles (APPs) were manually taken from a marina located on the margin of Patos Lagoon estuary (Rio Grande city -Southern Brazil), in December of 2014. APPs were collected during removal, by scrapping, of the commercial paint Micron Premium Blue - International[®] from one vessel. This paint is one of the most used brands in the studied area [47] being therefore these APPs, even from one boat and one removed method, representative about the impact of their released in aquatic systems. The APPs were selected, by color and shape, under the floor, using a inox tweezers. After, they were packed and transported in zip-locked bags to the laboratory, where visible extraneous particulates (e.g. macroalgae, barnacles) were removed. Then, APPs were crushed using a porcelain pestle and mortar and sieved through nylon meshes (63 μm). Fractionated samples were stored in dark individual glass vials under 4 °C until chemical and toxicological analyses.

2.2. Sediment collection and Spike

The sediment used for bioassays was collected from a pristine area located in Patos Lagoon estuary. The occurrence of more common antifouling biocides and metals was also investigated in these samples (as described below, item 2.3). Sediments were transported to the laboratory, where they were then homogenized, frozen (- 20°C) and freeze-dried for 72 h before being spiked using APPs according to the EPA guide [28]. In brief, 50 g of freeze-dried sediment was placed in Erlenmeyer flasks and 5 mL of distilled water was then added. After, 5 mg, 25 mg, 125 mg, 625 mg and 3,125 mg of APPs were added, representing 0.01%, 0.05%, 0.25%, 1.25% and 6.25% of APPs by mass of sediment, respectively. Sediments were then continuously shaken for five days. These exposure levels were chosen according to values reported by Takahashi et al. [22] and Singh & Turner [23], from some sites in southwest England. After procedures, spiked sediments were stored at 4 °C until chemical and toxicity analyses.

2.3 Metal and organic biocide analysis

Metal composition in APPs and in each spiked sediment was determined. For this, approximately 0.2 g of sediment were weighted, followed by addition of 6 mL of concentrated HNO₃ and 1 mL of concentrated HF. The digestion was performed in a

microwave oven (model Speedwave four, Berghof, Germany) using the following irradiation program: *i*) hold for 15 min at 180 °C (ramp of 10 min) and *ii*) hold for 20 min at 50 °C (ramp of 5 min). Digests were diluted to 100 mL, after which Cr, Mn, Ni, Pb, Cu and Zn were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Optima 4300 DV, Perkin Elmer, USA). The monitored wavelengths were 267.716 nm (Cr), 259.372 nm (Mn), 231.604 nm (Ni), 220.353 nm (Pb), 324.752 nm (Cu) and 206.200 (Zn). Accuracy of analysis was evaluated by elements determination in the certified reference materials (PACS-2 e MESS-2). The limits of quantification (LOQ) of metals were 2.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0.7 $\mu\text{g g}^{-1}$, 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$, 7.2 $\mu\text{g g}^{-1}$, 6.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 6.9 $\mu\text{g g}^{-1}$, for Cr, Mn, Ni, Pb, Cu and Zn, respectively. All samples were analyzed in triplicate.

Extraction of the organic biocides Irgarol 1051, Diuron, TCMTB and DCOIT was performed according to Martinez and Barceló [29] and Harino et al. [30] and adapted to APPs. Approximately 0.1 g of APPs and 1 g of dried sediment were accurately weighted into 25 mL glass vials. Samples were spiked with 10 ng L^{-1} of Atrazine d5 (100 ng L^{-1} , surrogate standard), after which 10 mL of acetonitrile was added. Samples were then mixed for 1 min, sonicated (50 °C for 30 min) and then centrifuged (4,000 rpm for 7 min). This step was repeated three times. The resulting supernatants were combined and evaporated (Syncore[®]) to 1 mL. After volume reduction, the extracts were cleaned by solid phase extraction (SPE) using C18 cartridges previously activated with 4 mL of ethyl acetate and ultrapure water (Milli-Q[®]). The extracts were diluted with 50 mL of ultrapure water, passed through SPE cartridges, dried for 1 h and then eluted 2 times using 2 mL of ethyl acetate. The eluates were decreased by volume under nitrogen flow to 1 mL before being transferred to a new vial with methanol. All obtained APPs and sediment extracts were also analyzed in triplicate. Chromatographic analyses were carried out in a LC-ESI-MS/MS (Alliance Separations, model 2695, Waters - Milford, MA, USA) using Waters X Terra MS C18 columns (3.0 x 50 mm, 3.5 μm) and mobile phase composed of acid water (0.1% acetic acid:methanol). The limits of quantification (LOQ) were 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ to Diuron, Irgarol 1051 and TCMTB, and 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ to DCOIT whereas the limits of detection (LOD) were 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ to all compounds.

2.4 Bioassay Set up

The epibenthic harpacticoid *Nitokra sp.* were obtained from a stock culture maintained at the Universidade Federal do Rio Grande, Southern Brazil, established since 2010. The organisms were cultivated without aeration in artificial saline water (Coralife[®] sea salt), at salinity 10 ± 1 , temperature 25 ± 2 °C, and a 16L:8D photoperiod [31]. The copepod from genus *Nitokra* have been widely used in ecotoxicological tests [17, 32, 33, 34, 35].

Chronic toxicity was assessed via fecundity using whole sediment according to Lotufo & Abessa [31]. Three replicates were set at each exposure level using 2 g of sediment with 15 mL of saline water (salinity 10) added as dilution. Following a short period of equilibration (12 h), five ovigerous females were added in each experimental unit. Fish food solution (1mL) was added at the beginning of each assay in each test chamber. Assays were maintained under the same conditions as the cultivation period. After 10 days of exposure, formalin and Rose-Bengal dye (4%) was added to each experimental unit to preserve and identify the animals. Stained organisms (adults, copepodits and nauplii) were counted using a stereomicroscope. Fecundity was expressed as the average number of offspring per adult.

Acute testing was performed with sediment elutriates. Elutriates were prepared according to the EPA guide [28] using 4 parts of water (salinity 10) to 1 part of sediment, by volume. The resulting mixture was stirred for 1 h. The water phase was separated from sediment by centrifugation (Cientec[®]) and used in acute toxicity tests. Ten adult copepods were added to each experimental unit and after 96 h of exposure the number of living organisms was recorded. Toxicity results were expressed as % of copepod survival and the concentration at which 50% of the organisms experienced mortality (LC_{50}).

Temperature, salinity, pH and dissolved oxygen were measured (Hanna Multiparameters Edge HI2020-02) in all control and treatment concentrations and at the beginning and end of the experiments.

2.5 Statistical analysis

LC_{50} calculations for the acute tests using *Nitokra sp.* were performed with the software Trimmed Spearman Karber. For the chronic tests, the differences among exposure treatments were evaluated via One-way ANOVA ($p > 0.05$) and subsequent Tukey's post hoc tests. Prior to statistical analyses, the normality and homogeneity of data were verified using

Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. ANOVA statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism (v 5.02 for Windows, San Diego, USA).

3. Results and Discussion

3.1 Antifouling paint particles as a continuous source of metals and booster biocide.

Sediments used as control presented 0.63% of total organic carbon (TOC) and 11% clay/silt (> 0.063 mm). The concentrations of metals in control sediment are showed in figure 1. These levels corroborate background values found for these elements in sediments from Patos Lagoon estuary [36]. Regarding booster biocides, Irgarol 1051, Diuron, TCMTB and DCOIT were not detected in control samples.

All analyzed metals (Cr, Mn, Ni, Pb, Cu and Zn) were detected in antifouling paint particles (APPs). Copper was the most abundant metal in APP samples followed by Zn, Pb, Ni, Cr and Mn, respectively. Regarding booster biocides, only DCOIT was detected in all analyzed samples (Table 1). In addition, DCOIT was also detected in analyzed spiked sediments only in the high concentration treatments (1.25 and 6.25% of APPs) with averages (\pm SD) $1.85 \pm 0.2 \text{ ng g}^{-1}$ and $15.8 \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$, respectively.

APPs collected showed the presence of Cu and Zn, which are frequently used as biocides in paint formulations [4,5,37]. These results are in agreement with the Material Safety Data Sheet (MSDS) [38] of the product Micron Premium Blue[®] - International, which was the primary paint applied to the boat in the studied marina. This MSDS reports the presence of Zn and Cu oxides, DCOIT (4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one) and Copper Pyrithione (bis(1hydroxy-2(1H)-pyridethionato-O,S)-T-4 copper) as booster biocides in the paint formulation. Thus, the metal levels detected in these APPs are likely originating from both oxide and organometallic molecules [4].

The occurrence of metals in APPs has been reported previously (Table 1). The differences observed in metal concentrations could be explained by the release rate related to either coating term or the original paint formulation. With respect to other paint formulations, Cu and Zn are present in some organometallic biocides such as Cu/Zn pyrithiones, copper naftenate, zineb (zinc ethane-1,2-diylbis(dithiocarbamate)) and ziram (zinc dimethyldithiocarbamate) [4]. Moreover, the high content of Cu and Zn found in the present investigation and elsewhere (Table 1) is likely related to the recent (2008) world-wide ban of the tributyltin-based antifouling paints [2]. From the remaining analyzed metals, Pb concentrations were the third highest. Lead compounds used to be added to the primer paint

layers - to prevent corrosion and to enhance drying - which were applied either on ship or on boat hulls before the antifouling coatings [39,40]. Although this element was not mentioned in Micron Premium MSDS, a mean Pb concentration of $510 \mu\text{g g}^{-1}$ has been reported in the literature [47]. In addition, lower levels of Ni, Mn and Cr were detected (Table 1). These metals have also been reported in other studies and they may represent components of the metallic based materials attached to paint fragments [23, 41]. Thus, the elemental composition identified in APPs obtained in the studied area is similar to that which has been described in previous studies (Table 1).

Few studies have analyzed organic and organometallic booster biocide compounds in APPs (Table 1). The present study represents the first report of DCOIT associated with APPs. This compound has been described as the main booster biocide used in modern antifouling paint systems, and it is typically applied to leisure boats [42]. As indicated regarding the metals above (Table 1), differences in APP composition can reflect the use of different antifouling paint formulations in boat maintenance facilities, along with the high release rates of these compounds or even methodological shortcomings related to each study. According to Micron Premium Blue[®] MSDS, Copper Pyrithione is used in its formulation. However, the chemical determination of this biocide in environmental samples is very difficult due to its tendency toward a transchelation reaction in the presence of zinc [4]. Consequently, this compound was not analyzed in the present investigation. The high levels of Cu may be related to Copper Pytithione and it suggests that this compound may persist in APPs, as has been previously reported [23, 26, 43].

The occurrence of APPs in estuarine sediments within the area of influence of boat maintenance facilities and marinas [21, 22, 44] highlights the potential environmental risk associated with these residues. Coastal marine environments may be significantly impacted by APPs that represent an important local source of contamination by metals [23].

Taking into account the chemical composition of APPs, it is clear that the suitable disposal of APPs in boatyards is fundamental to avoid or minimize aquatic contamination. Unfortunately, no controlled waste management has been carried out in the studied marina and APPs generated during maintenance procedures have been discarded directly to the aquatic environment. The presence of these residues in the aquatic systems may be causing damage to local aquatic organisms as a result of the leachate of hazardous substances from APPs [6, 27].

3.2 Benthic organisms under APPs exposure.

Sediments spiked with APPs presented high toxicity to the epibenthic copepod *Nitokra sp.*, reducing fecundity and causing mortality. In sediments spiked with lower levels of APPs (0.01% by mass of sediment), a significant decrease in *Nitokra sp.* fecundity was observed (Fig. 2a). This toxicity is likely due to the presence of metals such as Cu and Zn (Fig. 1), which were detected in tested sediments. Although the biocide DCOIT was not found in this APP concentration exposure, low levels of DCOIT - below the detection limit of our analytical method (1 ng g^{-1}) - may be present and contributing to increase the toxicity. The chronic effects of DCOIT have been only observed in a sea urchin with NOEC of 1 fg L^{-1} [50]. Cu and Zn toxicity to aquatic organisms has been well documented in the last 30-40 years [45]. In addition, a possible influence of copper pyriithione (CuPt) on the toxicity of APPs should be considered, as this organometallic compound is present in the paint formulation (Micron Premium Blue[®] MSDS). Bao et al. [46] have reported acute toxicity and synergistic effects of CuPt and Cu on the marine copepod *Tigriopus japonicas*, whereby the authors showed an increase in nauplii mortality and a decrease in nauplii development related to Cu concentration.

These toxicological results highlight the important environmental impacts caused by APPs, which are currently unknown in many areas, including coastal South America. Further, APP contamination has been overlooked by environmental regulations, even though these compounds are often present at dangerous concentrations in coastal environments [20]. APPs deposited in sediment may become toxic due to leaching of hazardous substances present in antifouling paint formulations (*i.e.*: metals, organic and organometallic biocides) into porewater, which may be partially reabsorbed to sediments particles [23]. The sediment foraging behavior of *Nitokra sp.* may lead to exposure to compounds released from APPs and/or by superficial contact with porewater.

Exposure to toxic APP related compounds in shallow sediment is an expected finding in the present study area (margin of Patos Lagoon estuary - Southern Brazil). The present results indicate a 36% reduction in *Nitokra sp.* fecundity (Fig. 2a) at $30 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ and $6.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ of Cu and Zn in tested sediments, respectively (Fig. 1). These data suggest that euryhaline crustaceans will most likely be affected in areas under the influence of boat maintenance facilities, since relevant levels of Cu ($20 - 40 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) and Zn ($40 - 50 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) were found in sediments obtained in front of the studied marina and were related to the presence of APPs

[47]. Other assessments in estuarine sediments, performed in areas under harbor and boatyard influence, have observed that the presence of metals in these sediments, such as Cr, Cu, Pb, Mn and Zn, also affected fecundity of *Nitokra sp.* [33, 34].

Copepod survival, after exposure to elutriate of sediments spiked with APPs was investigated in the present study. The observed survival was 66.7, 56.7, 23.3, 0 and 0% for exposure levels of 0.01, 0.05, 0.25, 1.25 and 6.25% of APPs by mass of sediment, respectively (Fig. 2b). When the lethal concentration for 50% of the organisms was calculated by TSK software, an exposure levels of 0.14% of APPs in sediment was responsible for this toxic effect. These results suggest that the resuspension of sediments contaminated with APPs could be able to leach out compounds such as Cu and Zn into the water solution, keeping them available (probably as dissolved phase) to organism. As in fecundity tests, the mortality could be also related to the presence of DCOIT which was below of the detection limit in sediments samples (treatments 0.01%, 0.05% and 0.25%) and CuPt, which was not analyzed, but as they are present in the paint formulation, could have been released to water during the sediment resuspension. Extrapolating these results to an environmental condition, the resuspension of sediments contaminated with APPs could to produce deleterious effects on planktonic (and/or pelagic) local biota. This observation agrees with other studies that have shown toxic effects of elutriate from sediment contaminated with APPs on different organisms, including: *i*) a decrease in growth of the green macroalga *Ulva intestinalis* in the presence of Irgarol 1051 derived from APPs [18], and *ii*) bioluminescence inhibition in *Vibrio fischeri*, growth inhibition in *Ceramium tenuicorne*, and larval development decrease in *Nitocra spinipes* in the presence of Cu and Zn from APPs [44].

To better understand how leached compounds from APPs can be toxic when in a solution phase, some studies that investigated the toxicity of single biocides compounds (metallic or organic) to *Nitokra sp* [32, 54, 55] can be analyzed. Regarding metals, in water the results about the toxicity of Cu and Zn are contradictory. Ytreberg [32] showed that Zn appears to be more toxic than Cu, presenting a $LC_{50} - 96h$ of $900 \mu g Zn L^{-1}$, while for Cu $LC_{50} - 96h$ is $2100 \mu g Cu L^{-1}$. However, Wang [55] found a LC_{50-96h} of $350 \mu g Cu L^{-1}$ whereas for Zn no effect in survival was observed in concentrations up to $500 \mu g L^{-1}$. Our results, showed that metals from APPs needed a minor concentration to present toxicity to *Nitokra sp* suggesting the importance of metal mixture on the toxicity effects. A binary

mixture of Cu-Zn produced either additive effects or synergism toxicity effect in *Daphnia magna* [56].

In addition, it must be pointed out that some physical parameters may influence the toxicity of some chemical compounds. For several metals the effect of salinity on their bioavailability is related to their chemical speciation. Also, pH influence the toxicity of trace metals, either by affecting their chemical speciation in water or by competing with metals for sites on biological membranes [57]. In addition, it has been known that dissolved organic matter apply an important protective effect against metal toxicity due the formation of metal-organic complexes, thus reducing bioavailability and toxicity [57, 58]. A full explanation of the effects of water properties in APPs toxicity, nevertheless, requires further investigation.

The toxicity of DCOIT to different aquatic organisms, including acute toxicity to algae, crustaceans and polychaetes has been indicated by various studies [48, 49], including those not directly related to APPs. It is important to emphasize the possibility of complex mixtures within sediment contamination, which may include both metals and organic biocides, and possible synergistic interactions that increase the toxicity of APPs [51]. The observed toxicity of APPs can be related to other compounds present in these residues, such as binders, solvents and preservatives normally present in antifouling paint formulations [17]. Therefore, the combination of these compounds, especially metals such as Cu, Zn, Pb, and DCOIT may increase the toxicity of APPs when compared with these elements individually.

Finally, this study presents the first empirical evidence of lethal and chronic toxicity of APPs to benthic organisms, at environmentally relevant concentrations [22,23] observed in coastal areas under the influence of boat maintenance facilities.

4. Conclusion

Laboratory test showed that even after removal from the hulls of ships and boats, APPs may contain high levels of toxic metals and organic compounds that may be released into sediments and the water column, acting as a local source of metal and organic contaminants and, consequently, affecting epibenthic organisms. The present results emphasize the importance of improved regulations in areas of boat maintenance in order to avoid further spread of contaminants in aquatic environments, whereas highlight the need of further studies to contribute for the understanding of APP toxicity.

Acknowledgments

S. Soroldoni is a PhD candidate at Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG) sponsored by CAPES. This research was supported by CNPq (Project 481267/2013-1) and FINEP (Project 672-PO-14-AIBRASIL). I.B. Castro was sponsored by CNPq (PQ 306486/2015-6). We thanks Dr. Ednei Primel and his team (LACOM) for LC analyses and Dr. Gilberto Fillmann (CONECO) for laboratory support. We also thank to Samantha Vieira da Silva for help in the development of the experiment. Special thanks to Dr. Juliana Ivar do Sul and Dr. Fernanda Quaglio for the contributions in manuscript revision.

6. References

- [1] A. Kotrikla, Environmental management aspects for TBT antifouling waste from the shipyards. *J. of Environ. Manag.* 90 (2009) 77-S85.
- [2] International Marine Organization. Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. <http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions> (Accessed 15.02.16)
- [3] K. V. Thomas, The use of broad-spectrum organic biocides, in: C. Helio, D.M. Yebra, *Advances in marine antifouling coatings and technologies*, Woodhead Publishing Limited, Boca Raton, Florida (2009) pp 522-553.
- [4] K.V. Thomas, S. Brooks, The environmental fate and effects of antifouling paint biocides, *Biofouling*. 26 (2009) 73-88.
- [5] I.B. Castro, E. Westphal, G. Fillmann, Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático, *Química Nova*. 34 (2011) 1021-1031.
- [6] K.V. Thomas, M. McHugh, M. Waldock, Antifouling paint booster biocide in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate, *Sci. of Total Environ.* 293 (2003) 117-127.
- [7] T.A. Albanis, D.A. Lambropoulou, V.A. Sakkas, I.K. Konstantinou, Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments, *Chemosphere*. 48 (2002) 475-485.
- [8] J.L. Zhou, Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England, *Sci. of Total Environ.* 406 (2008) 239-246.
- [9] Y. Sapozhnikova, E. Wirth, K. Schiff, M. Fulton, Antifouling biocides in water and sediments from California marinas, *Mar. Pollut. Bull.* 69 (2013) 189-194.

- [10] N.S. Kim, S. H. Hong, J. G. An, K. H. Shin, W. J. Shim, Distribution of butyltins and alternative antifouling biocides in sediments from shipping and shipbuilding areas in South Korea, *Mar. Pollut. Bull.* 95 (2015) 484-900.
- [11] M. Hjorth, I. Dahllöf, V. E. Forbes, Effects on the function of three trophic levels in marine plankton communities under stress from the antifouling compound zinc pyrithione, *Aquat. Toxicol.* 77 (2006) 105-115
- [12] F. Gallucci, I. B. Castro, F. C. Perina, D. M. S. Abessa, A. P. Teixeira, Ecological effects of Irgarol 1051 and Diuron on a coastal meiobenthic community: A laboratory microcosm experiment. *Ecol. Indic.* 58 (2015) 21-31.
- [13] A. R. Fernández-Alba, M. D. Hernando, L. Piedra, Y. Chisti, Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays, *Anal. Chim. Acta.* 456 (2002) 303-312.
- [14] G. Gatidou, N. S. Thomaidis, Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays, *Aquat. Toxicol.* 85 (2007) 184-191.
- [15] A. Koutsaftis, I. Aoyama, Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*, *Sci. of Total Environ.* 387 (2007) 166-174.
- [16] J. Bellas, Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates, *Sci. of Total Environ.* 367 (2006) 573-585.
- [17] J. Karlsson, E. Ytreberg, B. Eklund, Toxicity of antifouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organism representing three trophic levels. *Environ. Pollut.* 158 (2010) 681-687.
- [18] L. E. Tolhurst, J. Barry, R. A. Dyer, K. V. Thomas, The effect of resuspending sediment contaminated with antifouling paint particles containing Irgarol 1051 on the marine macrophyte *Ulva intestinalis*, *Chemosphere.* 68 (2007) 1519-1524.
- [19] A. Turner, S. Fitzer, G. A. Glegg, Impacts of boat paint ships on the distribution and availability of copper in an English ria, *Environ. Pollut.* 151 (2008) 176-181.
- [20] A. Turner, Marine pollution from antifouling paint particles, *Mar Pollut. Bull.* 60 (2010) 159-171.
- [21] A. Turner, Metal contamination of soils, sediments and dusts in the vicinity of marine leisure boat maintenance facilities, *J. Soils. Sediment.* 13 (2013) 1052-1056.

- [22] C. K. Takahashi, A. Turner, G. E. Millward, G. A. Glegg, Persistence and metallic composition of paint particles in sediments from a tidal inlet, *Mar. Pollut. Bull.* 64 (2012) 133-137.
- [23] N. Singh, A. Turner, Trace metals in antifouling paint particles and their heterogeneous contamination of coastal sediments, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 559-564.
- [24] A. B. Rees, A. Turner, S. Comber, Metal contamination of sediment by paint peeling from abandoned boats, with particular reference to lead, *Sci. of the Total Environ.* 494-495 (2014) 313-319.
- [25] A. Turner, S. Comber, A. B. Rees, D. Gkiokas, K. Solman, Metals in boat paint fragments from slipways, repair facilities and abandoned vessels: An evaluation using field portable XRF, *Talanta.* 131 (2015) 371-378.
- [26] R. Parks, M. Donnier-Marechal, P. E. Frickers, A. Turner, J. W. Readman, Antifouling biocides in discarded marine paint particles, *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 1226-1230.
- [27] C. K. Hasan, A. Turner, J. Readman, T. Frickers, Environmental risks associated with booster biocides leaching from spent anti-fouling paint particles in coastal environments, *Water Environ. Res.* 86 (2014) 2330-2337.
- [28] Environmental Protection Agency, Methods for Collection, Storage, and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual, EPA 823-B-01-002. Office of Water, Washington, DC (2001).
- [29] K. Martínez, D. Barceló, Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means ultrasonic extraction and HPLC – APCI – MS, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 940-945.
- [30] H. Harino, Y. Mori, Y. Yamaguchi, K. Shibata, T. Senda, Monitoring of antifouling booster biocides in water and sediment from the port of Osaka, Japan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48 (2005) 303-310.
- [31] G. R. Lotufo, D. M. S. Abessa, Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos, in: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Souza, M. G. Nipper, *Métodos de Ecotoxicologia Marinha: aplicações no Brasil*, Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo (2000) pp.151-162.
- [32] E. Ytreberg, J. Karlsson, B. Eklund, Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater, *Sci. of Total Environ.* 408 (2010) 2459-2466.

- [33] J. Nilin, L. B. Moreira, J. E. Aguiar, R. Marins, D. M. S. Abessa, T. M. C. Lotufo, L. V. Costa-Lotufo, Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil, *Mar. Environ. Res.* 91 (2013) 89-96.
- [34] M. Krull, D. M. S. Abessa, V. Hatje, F. Barros, Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries, *Ecotoxicol. and Environ. Contam.* 106 (2014) 195-203.
- [35] J. B. Camargo, A. C. Cruz, B. G. Campos, G. S. Araújo, T. G. Fonseca, D. M. S. Abessa, Use, development and improvements in the protocol of whole-sediment toxicity identification evaluation using benthic copepods, *Mar. Pollut. Bull.* 91 (2015) 511-517.
- [36] L. F. H. Niencheski, B. Baraj, R. G. Franca, N. Mirlean, Lithium as a normalizer for the assessment of anthropogenic metal contamination of sediments of the southern area of Patos Lagoon, *Aquat. Ecosyst. Health and Manag.* 5 (2002) 473-483.
- [37] E. Almeida, T. C. Diamantino. O, de Souza, Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. in Org. Coat.* 59 (2007) 2-20.
- [38] Material Safety Data Sheet, Micron Premium Blue[®], International – Akzo Nobel. http://datasheets1.international-coatings.com/msds/YBA937_USA_eng_B9.pdf. (Accessed 29.04.16)
- [39] R. Lambourne, The painting of ships, in: R. Lambourne, T. A. Strivens, *Paint and surface coatings: Theory and practice*. Woodhead Publishing, Cambridge (2000) pp.529-549.
- [40] I. Omae, Organotin antifouling paints and their derivatives, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 81-105.
- [41] A. Turner, A. Radford, Bioaccessibility of trace metals in boat paint particles, *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 73 (2010) 817-824.
- [42] H. Harino, Z. Arifin, I. F. M. Rumengan, T. Arai, M. Ohji, N. Miyazaki, Distribution of antifouling biocides and perfluoroalkyl compounds in sediments from selected locations in Indonesian coastal waters, *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 63 (2012) 13-21.
- [43] L. Holmes, A. Turner, Leaching of hydrophobic Cu and Zn from discarded marine antifouling paint residues: Evidence of transchelation of metal pyrrithiones, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3440-3444.
- [44] B. Eklund, L. Johansson, E. Ytreberg, Contamination of a boatyard for maintenance of pleasure boats, *J. Soils Sediments.* 14 (2014) 955-967.

- [45] S. J. Brooks, M. Waldoock, Copper biocides in the marine environment, in: C. Helio, D. M. Yeber, Advances in marine antifouling coatings and technologies, Woodhead Publishing Limited, Boca Raton, Florida (2009) pp. 522-553.
- [46] V. W. W. Bao, G. C. S. Lui, K. M. Y. Leung, Acute and chronic toxicity of zinc pyrithione alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*, *Aquat. Toxicol.* 157 (2014) 81-93.
- [47] L. D. F. Costa, N. Mirlean, J. C. Wasserman, M. Wallner-Kersanach, Variability of hazardous metals in estuarine sediments in areas under the influence of antifouling paints, southern Brazil, *Environ. Earth Sci.* 75 (2016) 580-592.
- [48] T. Onduka, D. Ojima, M. Ito, K. Ito, K. Mochida, K. Fujii, Toxicity of antifouling biocide Sea-Nine 211 to marine algae, crustacea, and a polychaete, *Fish Sci.* 79 (2013) 999-1006.
- [49] J. Bellas, Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates, *Sci. of Total Environ.* 367 (2006) 573-585.
- [50] N. Kobayashi, H. Okamura, Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin, *Mar. Pollut. Bull.* 44 (2002) 748-751.
- [51] N. Cedergreen, Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology, *PLoS ONE.* 9 (2014) e96580.
- [52] A. Turner, H. Pollock, M. T. Brown, Accumulation of Cu and Zn from antifouling paint particles by the marine macroalga, *Ulva lactuca*, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 2314-2319.
- [53] A. Turner, J. Hambling, Bioaccessibility of trace metals in sediment, macroalga and antifouling paint to the wild mute swan, *Cygnus olor*, *Water Air Soil Pollut.* 223 (2012) 2503-2509.
- [54] J. Karlsson, M. Breitholtz, B. Eklund, A practical ranking system to compare toxicity of antifouling paints, *Mar. Pollut. Bull.* 52 (2006) 1661-1667.
- [55] D. J. Ward, V. Perez-Landa, D. A. Spadaro, S. L. Simpson, D. F. Jolley, An assessment of three harpacticoid copepod species for use in ecotoxicological testing, *Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.* 61 (2011) 414-425.
- [56] J. S. Meyer, J. F. Ranville, M. Pontasch, J. W. Gorsuch, W. J. Adams, Acute toxicity of binary and ternary mixtures of Cd, Cu and Zn to *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. and Chem.* 34 (2015) 799-808.

[57] D. A. Wright, P. Welbourn, Environmental Toxicology, first ed., Cambridge University Press, 2001.

[58] K. A. C. De Schamphelaere, C. R. Janssen, Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*, Environ. Toxicol. and Chem. 23 (2004) 1115-1122.

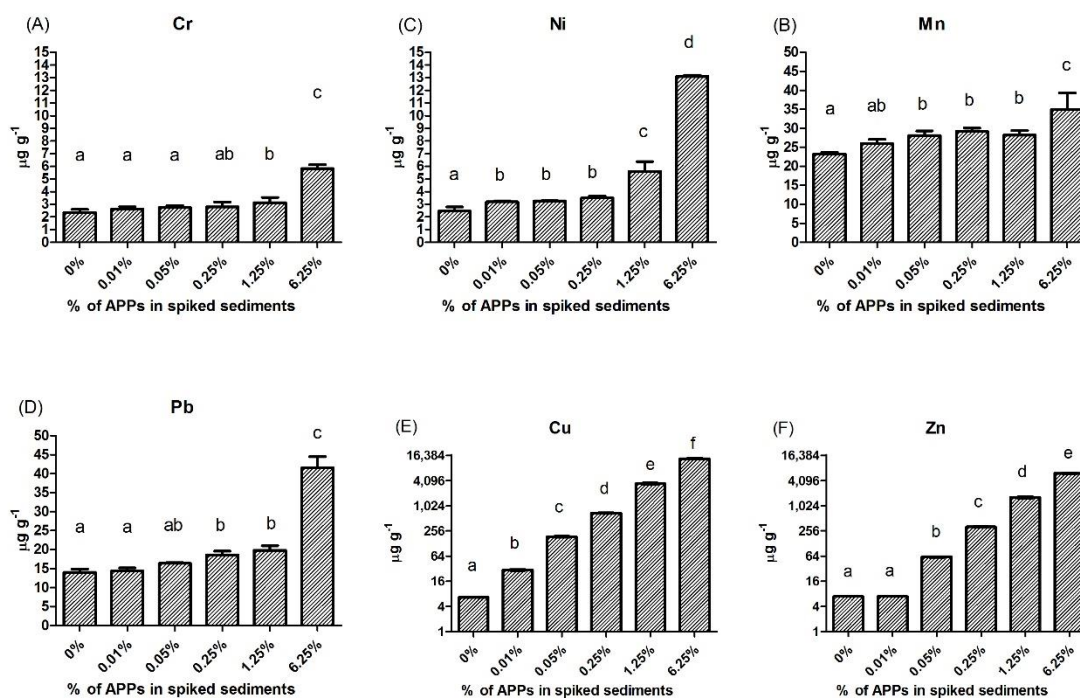


Figure 1: Concentrations (n=3) of Cr (A), Mn (B), Ni (C), Pb (D), Cu (E) and Zn (F) in sediments spiked with antifouling paint particles used in bioassays. Different lowercase letters indicate significant differences between the treatments. Error bars denote standard deviation.

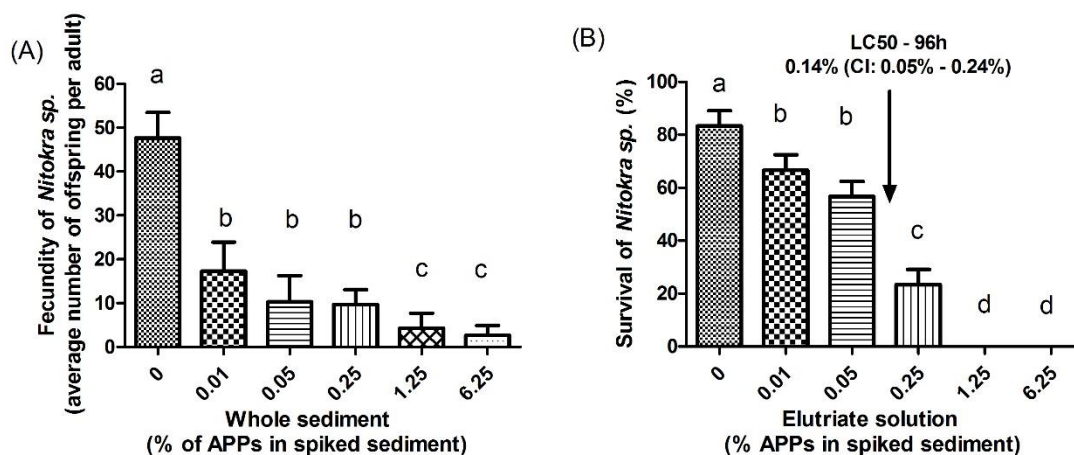


Figure 2: *Nitokra sp.* fecundity in whole sediment spiked with APPs (A) and (B) adult survival in elutriate of spiked sediment with APPs. Different lowercase letters indicate significant difference between the treatments. Error bars denote standard deviation.

Table 1: Levels of metals and organic booster biocides in APPs reported by different studies. N.a = Not analyzed; N.d = Not detected. The values were expressed in mean \pm standard deviation or minimum ~ maximum concentrations.

Metals ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
Location (reference)	Mn	Cr	Ni	Pb	Zn	Cu
Marina in Patos Lagoon estuary, Southwest Brazil (This study)	56 ± 0	67 ± 1	223 ± 4	512 ± 6	$112,404 \pm 845$	$234,247 \pm 268$
Boatyard in the southwest England [23]	75 ± 7	34 ± 1.5	149 ± 4	525 ± 34	$114,100 \pm 7,660$	$311,200 \pm 20,600$
Different sites in Southwest England [26]	n.a	n.a	n.a	n.a	13,700 ~ 158,000	23,400 ~ 376,000
Boat maintenance facility near Plymouth Estuary [52]	n.a	32 ± 5	139 ± 8	518 ± 18	$111,200 \pm 1,680$	$297,700 \pm 5,800$
Boat maintenance facility near Plymouth estuary [53]	n.a	37 ± 3	88 ± 3	534 ± 50	$38,400 \pm 770$	$140,600 \pm 5,620$
Booster biocides ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
Location (reference)	Irgarol 1051	Diuron	TCMTB	DCOIT		
Marina in Patos Lagoon estuary, Southwest Brazil (This study)	<0.01	<0.01	<0.01	0.13 \pm 0.03		
Different sites in Southwest England [26]	30 ~ 1,150	n.a	n.a	n.d		
Mayflower Marina, Southwest England [27]	2.98 ± 0.08	n.a	n.a	n.a		

Influência da interação organismo-sedimento na toxicidade das partículas de tintas anti-incrustantes

Sanye Soroldoni¹, Samantha Vieira da Silva¹, Ítalo Braga de Castro³, Camila de Martinez Gaspar Martins², Grasiela Lopes Leães Pinho¹

¹ Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (IO -FURG). Av. Itália s/n, Campus Carreiros, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (ICB – FURG). Av. Itália s/n, Campus Carreiros, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

³ Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo (IMAR-UNIFESP). Av. Almirante Saldanha da Gama, 11030400, Santos, SP, Brazil

Corresponding author: grasielapinho@hotmail.com

Resumo

As partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) são resíduos gerados principalmente durante a reparação e limpeza de embarcações. Devido a falta de regulação e fiscalização nas áreas de manutenção das embarcações, o sedimento pode ser considerado um dos destinos finais para as PTAs no ambiente aquático. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade das PTAs em sedimento para os microcrustáceos *Monokalliapseudes schubarti* e *Hyalella azteca*. O sedimento integral, fortificado com as PTAs, foi mais tóxico aos organismos do que o elutriado, sendo tal toxicidade atribuída às altas concentrações dos metais Cu, Zn e Sn. No sedimento integral, *M. schubarti* apresentou maior sensibilidade do que *H. azteca* evidenciando a influência da interação organismo-sedimento. Por ser escavador *M. schubarti* apresenta maior dependência e fica mais susceptível aos compostos lixiviados pelas PTAs do que *H. azteca* que interage na interface sedimento-água. Portanto, as PTAs são uma fonte contínua e localizada de contaminantes para os organismos bentônicos estuarinos.

Palavras-chave: Partículas de tinta anti-incrustantes, *Hyalella azteca*, *Monokalliapseudes schubarti*, Biocidas, organismos bentônicos

1. Introdução

As partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) são resíduos gerados principalmente durante a reparação e limpeza de embarcações em estaleiros, marinas e portos pesqueiros (Kotrikla, 2009; Turner, 2010). Estes resíduos apresentam uma composição heterogênea, uma vez que as tintas anti-incrustantes possuem em suas formulações biocidas e co-biocidas (Castro et al., 2011; Thomas and Brooks, 2010) que podem ser metálicos, orgânicos ou organo-metálicos. Adicionalmente, as PTAs podem conter diversas camadas com diferentes sistemas anti-incrustantes, dependendo dos procedimentos de manutenção utilizados. Além disso, apresentam ainda distintos formatos e tamanhos devido a variedade de técnicas empregadas na remoção do sistema anti-incrustante antigo das embarcações. Sendo assim, os resíduos de PTAs podem variar desde grandes lascas até um pó de baixa granulometria (Singh and Turner, 2009; Turner, 2013). Alguns estudos evidenciaram a ocorrência de PTAs em sedimentos obtidos próximo às áreas de manutenção de embarcações sugerindo o aumento na concentração dos compostos biocidas nos mesmos (Eklund et al., 2014; Takahashi et al., 2012; Thomas et al., 2002; Turner, 2013). Assim, esses estudos apontam a necessidade de uma avaliação do impacto que PTAs, em sedimento, podem causar a organismos aquáticos.

Alguns estudos mostram a presença de altas concentrações de elementos metálicos e compostos biocidas orgânicos nas PTAs (Hasan et al., 2014; Parks et al., 2010; Rees et al., 2014; Singh and Turner, 2009; Soroldoni et al., 2017), tornando o tema de extrema importância para áreas onde não existem regulações para a disposição correta desses resíduos. Apesar de existirem códigos de conduta mundiais que normalmente sugerem a coleta dos resíduos com destinação adequada dos mesmos (British Marine Federation, 2005; Environment Canada, 1995), algumas áreas de manutenção de embarcações não são totalmente reguladas. No Brasil, a única regulação pertinente ao tema foi estabelecida pela

Marinha do Brasil (Norman 23) (Diretoria de Portos e Costas, 2007), abrangendo apenas os resíduos de tinta que sejam provenientes de sistemas anti-incrustantes contendo Tributilestanho (TBT), não contemplando, portanto, os compostos utilizados nas formulações atuais.

Uma vez que a toxicidade e os impactos produzidos pelo uso de tintas anti-incrustantes (Karlsson et al., 2010; Karlsson and Eklund, 2004) bem como, dos compostos presentes nas mesmas (Bellas, 2006; Fernández-Alba et al., 2002; Gatidou and Thomaidis, 2007; Ito et al., 2013; Mochida et al., 2011; Onduka et al., 2013) já foram reportados para organismos não-alvo, estabelecer os níveis de toxicidade desses compostos quando associados a PTAs se faz importante. Considerando que o sedimento é o compartimento de deposição preferencial das PTAs nos ambientes aquáticos (Takahashi et al., 2012), o risco potencial para os organismos bentônicos deve ser avaliado. Além disso, a sensibilidade de organismos bentônicos a contaminantes está relacionada principalmente com o nível de interação com os sedimentos, assim como com seus hábitos de vida e alimentares, que influenciam no grau de exposição (Amato et al., 2016). Nesse sentido, poucos estudos reportaram a toxicidade das PTAs para organismos aquáticos (Soroldoni et al., 2017; Tolhurst et al., 2007; Turner et al., 2009).

Para o presente estudo dois organismos-teste foram escolhidos por apresentarem diferentes modo de interação com o sedimento, podendo levar a diferentes graus de toxicidade. O *Monokalliapseudes schubarti* é um organismo comum em substratos arenolodosos, encontrado desde estuários do Sul e Sudeste do Brasil até áreas costeiras do Uruguai (Fonseca and D’Incao, 2006; Leite and Leite, 1997) sendo espécie representativa e de grande importância ecológica para a região de estudo. Por outro lado, *Hyaella azteca* é uma espécie exótica no Brasil, amplamente distribuída na América do Norte, e considerado um organismo ideal para a avaliação da toxicidade por ter um curto ciclo de vida, ser

facilmente cultivado em laboratório e apresentar grande sensibilidade a compostos tóxicos (Environment Canada, 2013). São organismos epibentônicos com hábitos detritívoros e que vivem em contato direto com o sedimento, na interface sedimento – água (Othman and Pascoe, 2001). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade de sedimento fortificado em concentrações ambientalmente relevantes de PTAs para dois diferentes microcrustáceos bentônicos, *Hyalella azteca* e *Monokalliapseudes schubarti*.

2. Material e métodos

2.1. Seleção das partículas de tintas anti-incrustante

As partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) foram coletadas no estaleiro Santos localizado as margens do Estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil) em Dezembro de 2014, durante a remoção da pintura de uma embarcação de pesca de grande porte (medindo cerca de 27,2 m). A coleta das PTAs foi realizada com auxílio de uma espátula, retirando os fragmentos diretamente da embarcação e acondicionado-os em sacos do tipo *zip-locke*. Após coleta, as PTAs foram transportadas para o Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO). No laboratório elas foram então peneiradas e armazenadas em recipientes de vidro âmbar sob refrigeração (4 °C) até a sua utilização nas análises químicas e ecotoxicológicas apresentadas a seguir.

2.2. Fortificação do sedimento

Os sedimentos utilizados nos bioensaios foram coletados com auxílio de uma draga do tipo “van veen” na Ilha da Pólvora (Estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS, 32°02'36" S; 52°04'09" W). Esta área encontra-se distante de fontes potenciais de contaminação por biocidas anti-incrustantes, como portos e áreas de manutenção de embarcações. Após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório CONECO, onde então os sedimentos foram

homogeneizados e fortificados, utilizando a metodologia descrita no Manual de Coleta, Estocagem e Manipulação de Sedimentos para Análises Químicas e Ecotoxicológicas da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, sigla em inglês) (USEPA, 2001). Resumidamente, foram colocados em frascos de vidro previamente limpos e com capacidade para 3L, 750 g de sedimento liofilizado e as seguintes quantidades de PTAs: 0,3, 1,2, 4,2, 12,3 e 36,5 g representando 0,01, 0,04, 0,14, 0,49 e 1,50 % de massa de PTAs na massa de sedimento final, respectivamente. Os percentuais de PTAs escolhidos estão dentro de uma faixa previamente reportada para estuários sob influência de áreas de manutenção de embarcações (Singh and Turner, 2009; Takahashi et al., 2012). Posteriormente, os frascos foram colocados em uma mesa giratória para homogeneização, promovendo a mistura contendo sedimentos e PTAs por um período de 6 h e com uma rotação de 40 rpm. Após esse período, cerca de 200 mL de água destilada foram adicionados aos frascos com o intuito de reconstituir a umidade inicialmente removida durante a secagem do sedimento. Além disso, foram adicionados 1.750 g de sedimento úmido a mistura para alcançar a quantidade total necessária aos bioensaios e análises químicas. A partir dessa etapa, os sedimentos foram novamente homogeneizados por 6 h e a 40 rpm. Todas as etapas do procedimento de fortificação foram realizadas em sala com temperatura controlada e sem iluminação. Após a homogeneização, os sedimentos foram estocados sob refrigeração até a realização bioensaios e análises químicas.

Antes da etapa de fortificação, o sedimento coletado foi avaliado quanto a sua toxicidade em relação aos organismos teste e foi considerado não tóxico para ambas espécies.

2.3. Análises químicas

2.3.1. Determinação dos metais nas partículas de tintas anti-incrustantes e nos sedimentos de exposição

Para análise dos elementos metálicos, aproximadamente 0,2 g de sedimento e PTAs foram pesadas em duplicata, seguido da adição 6 mL de HNO₃ e 1 mL de HF, ambos concentrados. A digestão foi realizada em um forno micro-ondas (modelo Speedwave 4, Berghof, Alemanha) usando o seguinte programa de irradiação: i) mantendo por 15 min a 180 °C (rampa de aquecimento de 10 min) e ii) mantendo por 20 min a 50 °C (rampa de aquecimento de 5 min). Após a decomposição, os produtos da digestão foram transferidos para frascos volumétricos e aferidos a 25 mL com água ultrapura. Posteriormente, foram feitas sucessivas diluições dessas amostras (de 5 a 2.000 vezes, dependendo da amostra) em HNO₃ 5%, para a quantificação de Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn por espectroscopia de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, Optima 4300 DV, Perkin Elmer, USA). Os comprimentos de onda monitorados foram: 267.716 nm (Cr), 324.752 nm (Cu), 259.372 nm (Mn), 231.604 nm (Ni), 220.353 nm (Pb), 189.991(Sn) and 206.200 (Zn). A acurácia da análise foi determinada pela análise dos elementos nos materiais certificados ((PACS-2 e MESS-2). Os limites de quantificação (LQ) dos metais foram 1,0, 4,19, 0,14, 2,57, 7,58, 7,82 e 0,63 µg g⁻¹, para Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn, respectivamente.

2.3.2. Determinação dos metais no elutriato

As amostras de elutriato do sedimento foram analisadas quanto a presença dos elementos metálicos. Alíquotas das amostras (cerca de 10 mL) foram filtradas (0,45 µm), adicionadas em tubos falcon previamente acidificados e então acidificadas com a adição de 250 µL de HNO₃ (Vetec). Os metais foram determinados por espectroscopia de absorção atômica em

modo chama (ContrAA 700). A curva de calibração foi construída com o padrão multi-elementos (Merk®). Os elementos determinados no elutriato foram Mn, Cr, Ni, Pb, Sn, Cu e Zn sendo seus respectivos limites de quantificação $18 \mu\text{g L}^{-1}$, $47 \mu\text{g L}^{-1}$, $57 \mu\text{g L}^{-1}$, $17 \mu\text{g L}^{-1}$, $35 \mu\text{g L}^{-1}$, $14 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.4. Bioensaios

2.4.1. Organismos teste

Os bioensaios foram realizados com duas espécies diferentes de microcrustáceos bentônicos, o tanaidáceo *Monokalliapseudes schubarti* (Mañé-Grazón, 1949) e o anfípoda *Hyalella azteca* (Saussure, 1858). *M. schubarti* é representantes da infauna bentônica com hábitos suspensívoros-detritívoros, ingerindo microalgas, diatomáceas e detritos disponíveis dentro dos tubos (Bemvenuti, 1997). Esses organismos normalmente vivem no infralitoral, em tubos em forma de U, entre 2 e 6 cm de profundidade, mas que podem chegar a até 15 cm de profundidade. Os organismos utilizados nos bioensaios foram coletados no estuário da Lagoa dos Patos, próximo aos Molhes da Barra, e levados ao laboratório para aclimação em água salinidade 5.

O anfípoda *H. azteca* é um organismo encontrado geralmente em habitat de água doce, mas consegue tolerar e se reproduzir bem em culturas com salinidade até 15 (USEPA, 2000). Os organismos utilizados nesse experimento são provenientes do cultivo estabelecido no Laboratório CONECO e foram aclimatados em água com salinidade 5 por no mínimo 6 meses antes dos testes com as PTAs, aumentando assim sua tolerância a salinidade e não comprometendo os testes (Environment Canada, 2013).

2.4.2. Ensaio com sedimento integral

Os ensaios de exposição do *M. schubarti* em sedimento integral foram realizados com 150 g de sedimento fortificado (conforme descrito no item 2.2) e 300 mL de água de diluição (água marinha autoclavada diluída com água destilada para alcançar a salinidade 5). No teste foram utilizados 50 organismos por amostra, sendo 10 organismos distribuídos nas 5 réplicas de cada amostra. Esse teste não contou com renovação de água, sendo a alimentação fornecida apenas no início do experimento (1 mL de ração composta). O teste teve duração de 10 dias, sendo a contagem dos organismos vivos e mortos realizada ao final do experimento e então calculada a CL_{50} . O experimento foi conduzido em sala com fotoperíodo (12hC:12hE) e temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) controlados e com aeração suave e constante. A metodologia aplicada foi baseada em Zamboni & Costa (2002).

Os ensaios com *H. azteca* foram realizados de acordo com a norma NBR 15470 (ABNT, 2007) com alterações para uso em água salgada, para qual foram utilizados 100 g de sedimento fortificado (conforme descrito no item 2.2) e 200 mL de água de diluição (água marinha autoclavada diluída com água destilada para alcançar a salinidade 5). Após um curto período de equilíbrio entre a água e o sedimento (12h), foram adicionados 50 organismos por amostra, sendo 10 organismos em 5 réplicas. O teste teve duração total de 10 dias e ao longo de sua realização, foi realizada a renovação de 2/3 da água de diluição e alimentação (1 mL de ração composta) três vezes durante o teste. Os ensaios foram mantidos em sala com fotoperíodo (12hC:12hE) e temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) controlados e com aeração suave e constante.

2.4.3. Ensaio com a fase aquosa do sedimento (elutriato)

Os ensaios para exposição dos organismos *M. schubarti* e *H. azteca* ao elutriato do sedimento foram realizados de maneira concomitante, utilizando para cada espécie 100 mL do

elutriato em cada unidade experimental. Nestes foram adicionados 20 organismos, sendo 5 organismos distribuídos em cada uma das 4 réplicas. O teste teve duração de 96h e foi realizado nas mesmas condições experimentais do teste com sedimento integral, porém sem aeração e fornecimento de alimento. Ao final do teste, os organismos vivos e mortos foram quantificados para o cálculo da CL_{50} .

No início e final de todos os ensaios os parâmetros de qualidade da água, tais como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade, foram medidos. Para ambos os testes (sedimento integral e elutriato), e ambos organismos, a validação dos ensaios se deu pela sobrevivência de no mínimo 80% dos organismos no tratamento controle (ABNT, 2007, Zamboni & Costa, 2002). Além disso, testes com substâncias de referência (DSS, para *M. schubarti* e KCL, para *H. azteca*) foram realizados com os lotes de organismos antes de cada ensaio com os tratamentos (Anexo D).

2.5. Análise dos dados

As CL_{50} referentes aos ensaios de exposição foram calculadas pelo teste Trimmed Spearman Karber (TSK) (Hamilton et al., 1975). As diferenças entre as médias da mortalidade dos organismos nos bioensaios e entre os meios de exposição foram analisadas através do teste ANOVA de duas vias com significância de 95%, seguido pelo teste complementar de Bonferri. Antes das análises, a normalidade e homogeneidade dos dados foram verificados usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os testes foram realizados através do software GraphPad Prism (v 5.02 para windows, San Diego, EUA).

3. Resultados

3.1. Análises químicas das partículas de tintas anti-incrustantes e do sedimento de exposição

As análises químicas das partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) utilizadas para fortificação do sedimento, indicaram a presença de todos os metais analisados (Tabela 1). Os metais Cu e Zn foram os encontrados em concentrações médias maiores (178.471 e 108.190 mg kg⁻¹, respectivamente) nas amostras de PTAs. Além disso, vale destacar a presença em altas concentrações (880 e 421 mg kg⁻¹, respectivamente) do Sn e Pb nas amostras de PTAs. Os outros metais, tais como Mn, Ni e Cr, foram encontrados, porém em menores concentrações.

Nos tratamentos de sedimento fortificado foi observado o aumento significativo (ANOVA, $p < 0,05$) nas concentrações de Cu e Zn, com o aumento da porcentagem de PTAs adicionadas (Tabela 1). Os níveis de Ni e Cr não apresentaram diferenças significativas (ANOVA, $p > 0,05$) entre os tratamentos. Similarmente, os níveis de Mn, Sn e Pb não apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA, $p > 0,05$) nas concentrações intermediárias de PTAs. Para esses elementos, foi observada diferença apenas no tratamento com maior percentual de fortificação por PTAs ($n = 3$).

Entre os metais analisados no elutriato do sedimento, apenas foram detectados Mn, Cu e Zn (Fig 1.). Como observado nas PTAs e no sedimento integral, o Cu e Zn foram detectados em maior concentração nas amostras. O Mn foi detectado apenas nos tratamentos correspondentes 0,49% e 1,50%, apresentando diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$) entre elas. O Zn foi detectado a partir do tratamento 0,14%, tendo os tratamentos apresentado diferenças significativas entre si (ANOVA, $p < 0,05$). O Cu foi detectado a partir do tratamento 0,01% e apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

3.2. Bioensaios

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda usando sedimento integral fortificado com as PTAs para os organismos *M. schubarti* e *H. azteca*, estão apresentados na tabela 2. Os organismos no sedimento controle apresentaram uma sobrevivência média de $100\% \pm 0\%$ e $96\% \pm 5\%$ ($n = 50$) para *M. schubarti* e *H. azteca*, respectivamente. Os testes com as substâncias de referência (Anexo I) ficaram dentro do valor esperado. O sedimento com a concentração de 0,04% de PTAs apresentou uma queda significativa na sobrevivência de *M. schubarti*, demonstrando toxicidade. Para *H. azteca*, a toxicidade foi observada a partir da concentração de 0,01%. Dessa forma, a $CL_{50} - 10$ dias de 0,16% (IC: 0,12 – 0,21%) de PTAs no sedimento foi calculada para o *M. schubarti*. Similarmente, para *H. azteca*, a $CL_{50} - 10$ dias foi de 0,45% (IC: 0,32 – 0,63%). Comparando a sensibilidade dos dois organismos no teste de sedimento integral, foi observada uma diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$) apenas na concentração de 0,49% de PTAs no sedimento (Fig. 2), sendo essa concentração tóxica aos dois organismos. Portanto, o resultado obtido indica que *H. azteca* é mais resistente a exposição a PTAs quando expostas via sedimento fortificado.

Considerando os ensaios de toxicidade aguda com o elutriado do sedimento, não foi verificada toxicidade para *M. schubarti* (Tabela 2), já que não foram observadas diferenças significativas em comparação com o tratamento controle. Sendo assim, não foi possível realizar o cálculo da CL_{50} para esse organismo. No entanto, para *H. azteca*, a $CL_{50} - 96h$ foi de 1,09% (IC: 0,68 - 1,73%), mostrando uma diferença significativa em relação ao tratamento controle apenas na maior concentração (1,50%) de PTAs testada. Comparando os resultados obtidos a partir do ensaio com elutriado para os dois organismos, foi observada diferença significativa apenas na maior concentração de PTAs no sedimento (1,50%). Nessa

comparação, o *M. schubarti* foi mais resistente aos compostos presentes no elutriado do que a *H. azteca* (Fig. 2).

4. Discussão

Os metais Cu e Zn, encontrados em concentrações significativas nas partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) coletadas no estaleiro Santos e utilizadas no presente trabalho são normalmente utilizados como biocidas em formulações de tintas anti-incrustantes objetivando de evitar a incrustação por organismos marinhos na superfície das embarcações (Almeida et al., 2007; Castro et al., 2011). Entretanto, é importante ressaltar que a presença de alguns metais na composição das PTAs pode ser devido a outros compostos não biocidas adicionados nas tintas anti-incrustantes, tais como primers, pigmentos e preservantes (Karlsson et al., 2010). Adicionalmente, podem também ser utilizados compostos organometálicos como biocidas potencializadores do efeito biocida dos metais cobre e zinco (ex: Cu e Zn piritona, Ziram, Zineb) (Castro et al., 2011; Thomas and Brooks, 2010).

A presença do Sn nas PTAs pode primeiramente sugerir a existência de camadas antigas de tinta anti-incrustante contendo tributilestanho (TBT) em sua formulação, uma vez que esse elemento não está presente na composição das tintas atualmente em uso (Castro et al., 2011; Ytreberg et al., 2016). Além disso, alguns produtos contendo TBT em sua formulação ainda podem ser obtidos no mercado, podendo portanto serem adicionados às tintas com o intuito de potencializar os seus efeitos (Turner and Glegg, 2014). Portanto, é importante ressaltar que, apesar de o TBT não ter sido analisado nas amostras do presente estudo, as PTAs podem ser uma fonte deste contaminante para o ambiente aquático, uma vez que níveis significativos de Sn foram encontrados nas amostras analisadas. Níveis de Sn também foram reportados em PTAs coletadas em estaleiros, barcos de lazer e embarcações

abandonadas do Reino Unido (Turner et al., 2014; Ytreberg et al., 2016), sendo a presença desse elemento atribuída a camadas antigas de tinta contendo TBT em sua formulação.

Embora o Pb tenha sido utilizado como biocida em tintas navais usadas em meados do século 19, não existem registros atuais do seu emprego para essa finalidade (Almeida et al., 2007). Entretanto, este elemento foi recentemente encontrado na composição de diferentes marcas de tinta utilizadas em estaleiros e marinas no Sul do Brasil (Costa et al., 2016). Dessa forma, é provável que sua presença nas PTAs analisadas, esteja relacionada com sua utilização em primers, secantes e inibidores de corrosão os quais são utilizados para a preparação do casco antes da pintura (Lambourne, 2000). De qualquer modo, uma vez que as PTAs atinjam o sedimento, estas podem atuar como uma fonte contínua desses metais para este compartimento. Adicionalmente, as PTAs bem como os compostos liberados para os sedimentos, podem ainda ser ressuspensos para a coluna d'água, causando por fim danos a saúde dos organismos presentes em ambos compartimentos. Os testes de toxicidade, por sua vez, são ferramentas amplamente utilizadas para avaliar os danos sofridos por organismos expostos a ambientes contaminados. Para os sedimentos (integral ou o seu elutriato), macroinvertebrados bentônicos são amplamente utilizados como organismos-teste, visto que vivem em contato com o este compartimento por longos períodos do seu ciclo de vida (Burton and Allen, 1992). O anfípoda *Hyaella azteca* e o tanaidáceo *Monokalliapseudes schubarti* utilizados no presente estudo, são representantes desse grupo de organismos.

Considerando os testes agudos com o elutriato (fase aquosa do sedimento; Fig 2b), o anfípoda *H. azteca* mostrou-se mais sensível do que o tanaidáceo *M. schubarti*. A partir de comparações prévias descritas na literatura, essa diferença de sensibilidade entre os organismos era esperada (Zamboni, 2000), sendo *M. schubarti* considerado uma espécie relativamente resistente (Abessa et al., 2006). Cabe ressaltar que nestes experimentos os

organismos se encontravam nas mesmas condições de exposição, estando ambos expostos ao meio líquido contendo o elutriato do sedimento enriquecido com as PTAs.

A ressuspensão de sedimentos contendo PTAs pode resultar na biodisponibilização de metais e biocidas orgânicos para a coluna d'água, afetando, portanto, os organismos nesse compartimento. Esse comportamento foi previamente observado com *H. azteca* no presente estudo, bem como em outros estudos com a alga *Ulva intestinalis* (Tolhurst et al., 2007) e o copépodo *Nitokra* sp. (Soroldoni et al., 2017). Considerando a exposição a elementos isolados, não existem muitos dados disponíveis na literatura comparando essas espécies. Entretanto, os valores de CL50 observados para o Zn em testes com *H. azteca* de (0,073 mg L⁻¹) e *M. schubarti* (5,80 mg L⁻¹) indicam novamente o primeiro como mais sensível (Brendolan, 2004; Phipps et al., 1995). Sendo assim, tal toxicidade se deve possivelmente as elevadas concentrações dos metais presentes no sedimento de exposição (Tabela 1) e que posteriormente foram lixiviados para o elutriato desse compartimento (Fig. 1).

Apesar de o Cu e Zn serem considerados metais essenciais para diversos organismos aquáticos, estes podem causar efeitos letais e sub-letais em diferentes espécies, sendo a intensidade desses efeitos normalmente relacionada a ocorrência de concentrações maiores que aquelas requeridas para as necessidades fisiológicas dos organismos (Matthiessen et al., 1999). Além disso, é importante ressaltar a possibilidade de efeito sinérgico entre Cu e Zn liberados pelas PTAs. Esse sinergismo, tem sido destacado previamente por outros autores e para outros organismos (Lynch et al., 2016; Meyer et al., 2015). Além disso, pelo menos parte da toxicidade observada, pode ser atribuída também a presença de eventuais compostos usados como co-biocidas orgânicos e não analisados no presente estudo. Entretanto, independentemente do contaminante responsável pela toxicidade aguda observada no presente estudo, a interação dos organismos com o sedimento pode ser um fator tão ou mais importante

que os níveis de compostos presentes neste compartimento. Visto que, essa interação, pode influenciar, diretamente na biodisponibilidade dos contaminantes para os organismos que vivem nesse compartimento.

Invertebrados bentônicos acumulam contaminantes depositados em sedimentos principalmente devido a adsorção na parede do corpo ou exoesqueleto, absorção através das superfícies respiratórias, ingestão de partículas de sedimento e alimento ou ainda absorção através da água (coluna d'água ou intersticial) (Hare et al., 2003; Reynoldson, 1987). Sendo assim, os hábitos alimentares e o comportamento escavador dos organismos utilizados em testes de toxicidade influenciará os resultados observados para o sedimento integral. (Hare et al., 2003). No presente estudo, essa diferença comportamental frente ao sedimento integral foi testada, resultando em sensibilidades contrárias as registradas para o elutriato produzido a partir do mesmo sedimento. Nestes experimentos, os sedimentos apresentaram toxicidade aguda para ambas espécies (Tabela 2), porém sendo o tanaidáceo *M. schubarti* mais sensível do que o anfípoda *H. azteca* (Fig. 2).

Conforme brevemente introduzido, o tanaidáceo *M. schubarti* é um invertebrado bentônico infaunal, que tem preferência por sedimentos compostos por areia fina, com teores mais elevados de silte, argila e matéria orgânica (Rosa-Filho and Bemvenuti, 1998). Nesses ambientes, *M. schubarti* escavam tubos em forma de U, que podem atingir até 15 cm de profundidade no interior do substrato. Entretanto, esses organismos demonstram preferência pelas camadas superficiais e sub-superficiais (0-5 cm), o que tem provavelmente relação com seu hábito alimentar suspensívoro (Rosa and Bemvenuti, 2006). Portanto, pela sua posição trófica, sendo parte da infauna de ambientes estuarinos, escavador e suspensívoro, o converte em um organismo dependente do sedimento e conseqüentemente susceptível aos contaminantes encontrados nas suas diferentes fases (Zamboni and Costa, 2002). Nesse

sentido, a construção dos túneis por organismos como o *M. schubarti* provoca alterações na química dos sedimentos pela mistura de zonas pré-estratificadas, aumentando a penetração de aceptores de elétrons, tais como O₂ dissolvido, NO₃⁻, em camadas anóxicas. Esse processo, pode gerar significativas mudanças na especiação, e biodisponibilidade da maioria dos metais lixiviados pelas PTAs presentes nas camadas sedimentares (Remaili et al., 2016), representando um maior risco de bioacumulação e toxicidade para os organismos bentônicos. Assim, a irrigação dos túneis com água superficial rica em oxigênio pode aumentar a mobilidade, resultando em lixiviação dos metais ligados pelas PTAs para a água dos túneis e a coluna d'água adjacente (De Jonge et al., 2012; Macleod et al., 2014). Dessa forma, como as PTAs agem como uma fonte contínua de metais para os sedimentos de exposição, a forma de interação com o sedimento e alimentação de *M. schubarti* os tornam mais sensíveis a esses elementos. Ademais, vale destacar que nos tratamentos com maiores concentrações de PTAs (0,49 e 1,50%), os organismos evitaram a construção de tubos, permanecendo na parte superficial do sedimento. Por outro lado, nas concentrações menores os organismos mantiveram o comportamento escavador. Mudanças significativas no comportamento de um organismo, tais como forrageamento, interação social e locomoção, podem acarretar em risco a sobrevivência da população. Portanto, evitar o sedimento contaminado é provavelmente um mecanismo de defesa dos organismos contra a presença dos contaminantes (Ward et al., 2013).

Contrário do comportamento acima citado para *M. schubarti*, o anfípoda *H. azteca*, ao, é um organismo epibentônico, ou seja, vive preferencialmente na interface sedimento-água. Na natureza, *H. azteca* obtém alimento principalmente pelo forrageamento de algas que crescem na superfície do sedimento e bancos de macrófitas (Wang et al., 2004), mas também podem ingerir matéria orgânica diretamente do sedimento. Nebeker & Miller (1988) notaram que,

apesar de preferencialmente buscarem contato com o sedimento, *H. azteca* escava o sedimento apenas quando é perturbado ou assustado, sendo geralmente observado na superfície do sedimento, rastejando e, as vezes, nadando na água. Comportamento semelhante foi registrado por (Wang et al., 2004), onde durante teste de toxicidade de 10 dias, não foram observadas atividade de escavação por esses anfípodos. Ao invés disso eles rastejavam na superfície do sedimento e frequentemente nadavam para a coluna d'água retornando rapidamente à superfície do sedimento. Porém, nem sempre esse comportamento é observado em laboratório. Borgmann et al. (2005) por exemplo, observaram os organismos escavando superficialmente sedimentos oxigenados por períodos prolongados durante os testes de toxicidade. Sendo assim, estudos sugerem que *H. azteca* acumula principalmente os compostos biodisponíveis na coluna d'água através da fase dissolvida ao invés de diretamente pelo sedimento (Alves et al., 2008; Wang et al., 2004). Ainda assim, vale destacar que particularidades do teste com *H. azteca* talvez possam interferir na concentração de contaminantes na coluna d'água durante um teste com sedimento integral. O protocolo seguido para realização do teste agudo com esse organismo indica a necessidade de renovação da água durante o ensaio agudo (10 dias) (ABNT, 2007; Environment Canada, 2013). Essa renovação, é importante pois afeta significativamente a sobrevivência de *H. azteca* nos sedimentos de exposição, mantendo estável a qualidade da coluna d' água, já que podem ocorrer mudanças excessivas de pH devido a reações químicas entre os componentes do sedimento e a coluna d'água (Borgmann and Norwood, 1999; Kubitz and Giesy, 1996).

Comparando as exposições via sedimento integral e elutriato (Fig 2), observou-se, como esperado, uma maior mortalidade no sedimento integral. O sedimento é o compartimento de particionamento preferencial de muitos contaminantes. Portanto, essa matriz ambiental normalmente apresenta concentrações de contaminantes ordens de

magnitude maiores do que é detectado na água (Nowierski et al., 2005). Ainda, vale ressaltar que biocidas orgânicos, tais como DCOIT, Diruon e Diclofluanida, quando introduzidos no sedimento associados a PTAs terão sua persistência e biodisponibilidade aumentada, afetando diretamente organismos bentônicos (Thomas et al., 2003). Sendo assim, no sedimento integral as PTAs presentes atuam como uma fonte contínua de contaminantes para os organismos expostos enquanto no elutriato estarão apenas os elementos que têm afinidade com a fase aquosa e foram lixiviados (Turner, 2010). Esse comportamento químico justifica a menor toxicidade observada no teste com elutriato.

Por fim, cabe ressaltar que as PTAs são resíduos frequentemente lançados dentro do ambiente aquático estuarino, local onde as atividades de manutenção de embarcações em portos, marinas e estaleiros são frequentes (Thomas et al., 2003; Turner, 2013, 2010). A ausência de controle e legislação abrangendo a geração e o descarte das PTAs no Brasil reforçam a importância de estudos avaliando os efeitos deletérios desse resíduo em organismos estuarinos. Complementarmente, os níveis de PTAs utilizados no presente estudo são ambientalmente realísticos (Singh and Turner, 2009; Takahashi et al., 2012), sendo os valores encontrados de CL_{50} dentro dos níveis de PTAs detectados nos sedimentos em frente às áreas de manutenção de embarcações do estuário da Lagoa dos Patos (Artigo 1 da presente tese). Desta maneira, o presente estudo mostrou que as PTAs acumular elementos em concentrações passíveis de causar efeitos tóxicos, agindo, assim, como uma fonte localizada e contínua de metais para o ambiente estuarino.

5. Conclusão

Os testes utilizando sedimentos fortificados com as partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs), tanto integral como seu elutriato, mostraram que esses resíduos atuam como uma fonte contínua e localizada de diversos metais para o sedimento, principalmente os

elementos Cu, Zn e Sn. Além disso, os sedimentos de exposição apresentaram alta toxicidade para *Hyalella azteca* e *Monokallipseudes schubarti*, sendo a exposição e o risco impostos pelos compostos lixiviados das PTAs aos organismos fortemente influenciado pela interação das espécies com o sedimento. No presente estudo, *M. schubarti* apresentou maior sensibilidade ao sedimento fortificado com as PTAs devido, provavelmente, ao seu hábito infaunal de escavação do sedimento. Além disso, as PTAs no sedimento produziram maior dano aos organismos testados do que quando resuspensas na coluna d'água como elutriato. Por fim, os níveis de PTAs ambientalmente realísticas, são capazes de causar mortalidade em organismos bentônicos destacando a importância do incentivo de práticas que melhorem o manejo e a disposição das PTAs em áreas de manutenção de embarcações a fim de evitar a contaminação dos ambientes aquáticos por esses resíduos.

Agradecimentos

S. Soroldoni é bolsista da CAPES e aluna de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG). Essa pesquisa foi financiada pelo CNPq (Projeto 481267/2013-1) e FINEP (Projeto 672-PO-14-AIBRASIL). I.B. Castro é pesquisador de produtividade do CNPq (PQ 306486/2015-6). Agradecemos ao Prof. Fábio Andrei Duarte do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelas análises nas amostras de sedimento.

6. Referências

- Abessa, D.M.D.S., Sousa, E.C.P.M. De, Tommasi, L.R., 2006. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Rev. Geol.* 19, 253–61.
- ABNT, 2007. NBR 15470 - Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade em Sedimento - Método de

- ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda).
- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings*. doi:10.1016/j.porgcoat.2007.01.017
- Alves, L.C., Borgmann, U., Dixon, D.G., 2008. Water-sediment interactions for *Hyalella azteca* exposed to uranium-spiked sediment. *Aquat. Toxicol.* 87, 187–199. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.016
- Amato, E.D., Simpson, S.L., Remaili, T.M., Spadaro, D.A., Jarolimek, C. V., Jolley, D.F., 2016. Assessing the Effects of Bioturbation on Metal Bioavailability in Contaminated Sediments by Diffusive Gradients in Thin Films (DGT). *Environ. Sci. Technol.* 50, 3055–3064. doi:10.1021/acs.est.5b04995
- Bellas, J., 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 367, 573–585. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.01.028
- Bemvenuti, C. E., 1997. Benthic invertebrates. In: Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J. P., Eds. *Subtropical convergence environments: the coast and sea in the southwestern Atlantic*. Springer - Verlag, Berlin, p. 43 - 46.
- Borgmann, U., Grapentine, L., Norwood, W.P., Bird, G., Dixon, D.G., Lindeman, D., Chapman, P.M., Goulet, R.R., Wang, F., 2005. Sediment toxicity testing with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: Relevance and application. *Chemosphere* 61, 1740–1745. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.011
- Borgmann, U., Norwood, W.P., 1999. Sediment toxicity testing using large water-sediment ratios: An alternative to water renewal. *Environ. Pollut.* 106, 333–339. doi:10.1016/S0269-7491(99)00104-9
- Brendolan, R.A., 2004. Utilização do microcrustáceo *Kalliapseudes schubartii* em testes de

- Ecotoxicologia. Diss. Mestr. em Biol. Mar. Universidade Federal Fluminense.
doi:10.1002/cfg.375
- British Marine Federation, 2005. Environmental code of practice: Practical advice for marine businesses, sailing clubs and training centres.
- Burton, G.A., Allen, G., 1992. Freshwater Benthic Toxicity tests, in: Allen, B.G. (Ed.), Sediment Toxicity Assessment. Lewis Publishers Inc, Boca Raton, pp. 213–240.
- Castro, Í.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. Quim. Nova. doi:10.1590/S0100-40422011000600020
- Costa, L.F.D., Mirlean, N., Wasserman, J.C., Wallner-Kersanach, M., 2016. Variability of labile metals in estuarine sediments in areas under the influence of antifouling paints , southern Brazil. Environ. Earth Sci. doi:10.1007/s12665-016-5355-5
- De Jonge, M., Teuchies, J., Meire, P., Blust, R., Bervoets, L., 2012. The impact of increased oxygen conditions on metal-contaminated sediments part I: Effects on redox status, sediment geochemistry and metal bioavailability. Water Res. 46, 2205–2214. doi:10.1016/j.watres.2012.01.052
- Diretoria de Portos e Costas, 2007. Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Antiincrustantes em Embarcações, Norman 23. Brasília.
- Eklund, B., Johansson, L., Ytreberg, E., 2014. Contamination of a boatyard for maintenance of pleasure boats. J Soils Sediments. doi:10.1007/s11368-013-0828-6
- Environment Canada, 2013. Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment Using the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca*, Science and Technology Branch. Ottawa.
- Environment Canada, 1995. Best Management Practices (BMPs) for Ship and Boat Building

- and Repair Industry in British Columbia to PCA Consultants Ltd. Vancouver.
- Fernández-Alba, a R., Piedra, L., Mezcua, M., Hernando, M.D., 2002. Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *ScientificWorldJournal*. 2, 1115–1120. doi:10.1100/tsw.2002.221
- Fonseca, D.B., D’Incao, F., 2006. Mortality of *Kalliapseudes schubartii* in unvegetated soft bottoms of the estuarine region of the Lagoa dos Patos. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 49, 257–261. doi:10.1590/S1516-89132006000300011
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2007.09.002
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R. V, 1975. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays.
- Hare, L., Tessier, A., Borgmann, U., 2003. Metal sources for freshwater invertebrates: Pertinence for risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9, 779–793. doi:10.1080/713610009
- Hasan, C.K., Turner, A., Readman, J., Frickers, T., 2014. Environmental Risks Associated with Booster Biocides Leaching from Spent Anti-Fouling Paint Particles in Coastal Environments. *Water Environ. Res.* 86, 2330–2337. doi:10.2175/106143014X14062131178835
- Ito, M., Mochida, K., Ito, K., Onduka, T., Fujii, K., 2013. Induction of apoptosis in testis of the marine teleost mummichog *Fundulus heteroclitus* after in vivo exposure to the antifouling biocide 4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H)-isothiazolone (Sea-Nine 211). *Chemosphere* 90, 1053–1060. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.08.052
- Karlsson, J., Eklund, B., 2004. New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Mar. Pollut.*

- Bull. 49, 456–464. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.02.034
- Karlsson, J., Ytreberg, E., Eklund, B., 2010. Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. *Environ. Pollut.* 158, 681–687. doi:10.1016/j.envpol.2009.10.024
- Kotrikla, A., 2009. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *J. Environ. Manage.* 90, S77–S85.
- Kubitz, J., Giesy, J., 1996. Changes in overlying water quality and sediment toxicity to *Hyalella azteca* during 10-day sediment bioassay: Static vs. renewal regimens, in: Munawar, M., Dave, G. (Eds.), *Development and Progress in Sediment Quality Assessment: Rationale, Challenges, Techniques & Strategies*. SPB Academics Pub. Amsterdam, Amsterdam, pp. 101–113.
- Lambourne, R., 2000. The painting of ships, in: Lambourne, R., Strivens, T. (Eds.), *Paint and Surface Coatings: Theory and Practice*. William Andrew Publishing, England, pp. 529–549.
- Leite, F.P.P., Leite, P.E.P., 1997. Desenvolvimento morfológico e dos ovários de *Kalliapseudes schubarti* Mañe-Garzon (Crustacea, Tanaidacea) do Canal de São Sebastião, São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 14, 675–683. doi:10.1590/S0101-81751997000300016
- Macleod, C., Eriksen, R., Simpson, S., Davey, A., Ross, J., 2014. Assessment of the environmental impacts and sediment remediation potential associated with copper contamination from antifouling paint (and associated recommendations for management).
- Matthiessen, P., Reed, J., Johnson, M., 1999. Sources and potential effects of copper and zinc concentrations in the estuarine waters of Essex and Suffolk, United Kingdom. *Mar.*

- Pollut. Bull. 38, 908–920. doi:10.1016/S0025-326X(99)00090-9
- Mochida, K., Amano, H., Onduka, T., Kakuno, A., Fujii, K., 2011. Toxicity and metabolism of copper pyrithione and its degradation product, 2,2'-dipyridyldisulfide in a marine polychaete. *Chemosphere* 82, 390–397. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.074
- Nebeker, A. V., Miller, C. E., 1988. Use of the amphipod crustacean *Hyaella Azteca* in freshwater and estuarine sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 1027-1033. doi: 10.1002/etc.5620071210
- Nowierski, M., Dixon, D.G., Borgmann, U., 2005. Effects of water chemistry on the bioavailability of metals in sediment to *Hyaella azteca*: Implications for sediment quality guidelines. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 322–332. doi:10.1007/s00244-004-0088-y
- Onduka, T., Ojima, D., Ito, M., Ito, K., Mochida, K., Fujii, K., 2013. Toxicity of the antifouling biocide Sea-Nine 211 to marine algae, crustacea, and a polychaete. *Fish. Sci.* 79, 999–1006. doi:10.1007/s12562-013-0678-6
- Othman, M.S., Pascoe, D., 2001. Growth , Development and Reproduction of *Hyaella azteca* (Saussure , 1858) in Laboratory Culture Author (s): M . Shuhaimi Othman and David Pascoe Reviewed work (s): Published by: BRILL Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/20106425> . *JSTOR is a. Crustaceana* 74, 171–181.
- Parks, R., Donnier-Marechal, M., Frickers, P.E., Turner, A., Readman, J.W., 2010. Antifouling biocides in discarded marine paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2010.03.022
- Phipps, G.L., Mattson, V.R., Ankley, G.T., 1995. Relative Sensitivity of Three Freshwater Benthic Macroinvertebrates to Ten Contaminants 286, 281–286.
- Rees, A.B., Turner, A., Comber, S., 2014. Metal contamination of sediment by paint peeling

- from abandoned boats, with particular reference to lead. *Sci. Total Environ.*
doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.064
- Remali, T.M., Simpson, S.L., Amato, E.D., Spadaro, D.A., Jarolimek, C. V., Jolley, D.F.,
2016. The impact of sediment bioturbation by secondary organisms on metal
bioavailability, bioaccumulation and toxicity to target organisms in benthic bioassays:
Implications for sediment quality assessment. *Environ. Pollut.* 208, 590–599.
doi:10.1016/j.envpol.2015.10.033
- Reynoldson, T.B., 1987. Interactions between sediment contaminants and benthic organisms.
Hydrobiologia 149, 53–66. doi:10.1007/BF00048646
- Rosa-Filho, J.S., Bemvenuti, C.E., 1998. Sedimento como fator limitante para a distribuição
de *Kalliapseudes schubartii* Mañé-Garzón, 1949 (Crustacea, Tanaidacea) em fundos
moles estuarinos. *Nauplius* 6, 119–127.
- Rosa, L.C., Bemvenuti, C.E., 2006. Seasonal Stratification of the Estuarine Macroinfauna of
the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *Thalassas* 22, 17–23.
- Singh, N., Turner, A., 2009. Trace metals in antifouling paint particles and their
heterogeneous contamination of coastal sediments. *Mar. Pollut. Bull.*
doi:10.1016/j.marpolbul.2008.11.014
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í.B., Duarte, F.A., Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint
particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *J. Hazard.
Mater.* 330, 76–82. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.02.001
- Takahashi, C.K., Turner, A., Millward, G.E., Glegg, G.A., 2012. Persistence and metallic
composition of paint particles in sediments from a tidal inlet. *Mar. Pollut. Bull.*
doi:10.1016/j.marpolbul.2011.10.010
- Thomas, K. V., McHugh, M., Hilton, M., Waldock, M., 2003. Increased persistence of

- antifouling paint biocides when associated with paint particles. *Environ. Pollut.*
doi:10.1016/S0269-7491(02)00343-3
- Thomas, K. V., McHugh, M., Waldock, M., 2002. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: Inputs, occurrence and environmental fate. *Sci. Total Environ.*
doi:10.1016/S0048-9697(01)01153-6
- Thomas, K. V., Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*. doi:10.1080/08927010903216564
- Tolhurst, L.E., Barry, J., Dyer, R.A., Thomas, K. V., 2007. The effect of resuspending sediment contaminated with antifouling paint particles containing Irgarol 1051 on the marine macrophyte *Ulva intestinalis*. *Chemosphere*.
doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.005
- Turner, A., 2013. Metal contamination of soils, sediments and dusts in the vicinity of marine leisure boat maintenance facilities. *J. Soils Sediments*. doi:10.1007/s11368-013-0686-2
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.*
doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Turner, A., Comber, S., Rees, A.B., Gkiokas, D., Solman, K., 2014. Metals in boat paint fragments from slipways, repair facilities and abandoned vessels: An evaluation using field portable XRF. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.012
- Turner, A., Glegg, G., 2014. TBT-based antifouling paints remain on sale. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 398–400. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.08.041
- Turner, A., Pollock, H., Brown, M.T., 2009. Accumulation of Cu and Zn from antifouling paint particles by the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Environ. Pollut.*
doi:10.1016/j.envpol.2009.03.026
- USEPA, 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical

- and Toxicological Analyses: Technical Manual. Washington, DC., pp. 1–16.
- USEPA, 2000. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Environmental Protection Agency. doi:EPA 600/R-94/024
- Wang, F., Goulet, R.R., Chapman, P.M., 2004. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: The gap between laboratory and nature. *Chemosphere* 57, 1713–1724. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.050
- Ward, D.J., Simpson, S.L., Jolley, D.F., 2013. Avoidance of contaminated sediments by an amphipod (*Melita plumulosa*), A harpacticoid copepod (*Nitocra spinipes*), and a snail (*Phallomedusa solida*). *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 644–652. doi:10.1002/etc.2086
- Ytreberg, E., Bighiu, M.A., Lundgren, L., Eklund, B., 2016. XRF measurements of tin, copper and zinc in antifouling paints coated on leisure boats. *Environ. Pollut.* 213, 594–599. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.029
- Zamboni, A.J., Costa, J.B., 2002. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando tanaidáceos. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. (eds.), *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Salvador - BA. pp. 179-188.

Tabela 1: Concentrações dos metais nas PTAs utilizadas no experimento e no sedimento de exposição. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão (mg kg^{-1}). As letras subscritas diferentes indicam diferença significativa obtidas através do teste One-Way ANOVA ($p < 0,05$) na concentração do metal entre os tratamentos.

Sedimento	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Sn	Zn
0%	19,1 \pm 1,4 ^a	8,26 \pm 0,08 ^b	133 \pm 2 ^h	< 2,57* ^l	< 7,58*	7,53 \pm 1,31 ^o	25,4 \pm 1,1 ^s
0,01%	23,6 \pm 4,7 ^a	12,2 \pm 0,1 ^c	128 \pm 2 ⁱ	< 2,30* ^l	<7,58*	10,0 \pm 0,8 ^p	29,9 \pm 1,3 ^t
0,04%	19,7 \pm 0,7 ^a	51,7 \pm 0,9 ^d	134 \pm 2 ^h	< 2,30* ^l	<7,58*	11,5 \pm 0,2 ^q	52,5 \pm 0,5 ^u
0,14%	19,2 \pm 1,4 ^a	695 \pm 168 ^e	125 \pm 2 ⁱ	< 2,30* ^l	12,9 \pm 6,0^{mm}	12,0 \pm 2,9 ^q	373 \pm 76 ^v
0,49%	22,1 \pm 0,8 ^a	896 \pm 18 ^f	133 \pm 4 ^{hi}	< 2,30* ^l	7,6 \pm 0,2 ^m	13,0 \pm 1,0 ^q	470 \pm 7 ^x
1,50%	21,0 \pm 0,7 ^a	1641 \pm 502^g	139 \pm 1 ^j	< 2,30* ^l	19,8 \pm 9,1ⁿ	23,2 \pm 3,9 ^r	907 \pm 293^z
PTA	68,6 \pm 18,2	178.471 \pm 6448	232 \pm 6	141 \pm 8	421 \pm 12	880 \pm 42	108.190 \pm 2409
LQ*	1,00	4,19	0,114	2,57	7,58	7,82	0,63

*LQ: limite de quantificação

Valores em negrito: desvio padrão relativo (RSD) acima de 20%

Tabela 2: Sobrevivência de *Monokalliapseues schubarti* e *Hyalella azteca* nos testes de toxicidade aguda com sedimento integral (n = 50) e elutriato do sedimento (n = 40). Valores expressos como porcentagem média \pm desvio padrão.

Tratamentos	Sedimento integral		Elutriato	
	<i>M. schubarti</i>	<i>H. azteca</i>	<i>M. schubarti</i>	<i>H. azteca</i>
0%	100 \pm 0 ^a	96 \pm 5 ^a	95 \pm 10 ^A	100 \pm 0 ^A
0,01%	88 \pm 8 ^b	76 \pm 9 ^b	100 \pm 0 ^A	100 \pm 0 ^A
0,04%	68 \pm 11 ^b	76 \pm 5 ^b	100 \pm 0 ^A	93.3 \pm 11.5 ^A
0,14%	70 \pm 18 ^b	60 \pm 10 ^c	100 \pm 0 ^A	86.7 \pm 11.5 ^A
0,49%	8 \pm 8 ^c	36 \pm 9 ^d	s.d	86.7 \pm 23 ^A
1,50%	4 \pm 4 ^c	6 \pm 5 ^e	80 \pm 16 ^A	40 \pm 0 ^B

Figuras:

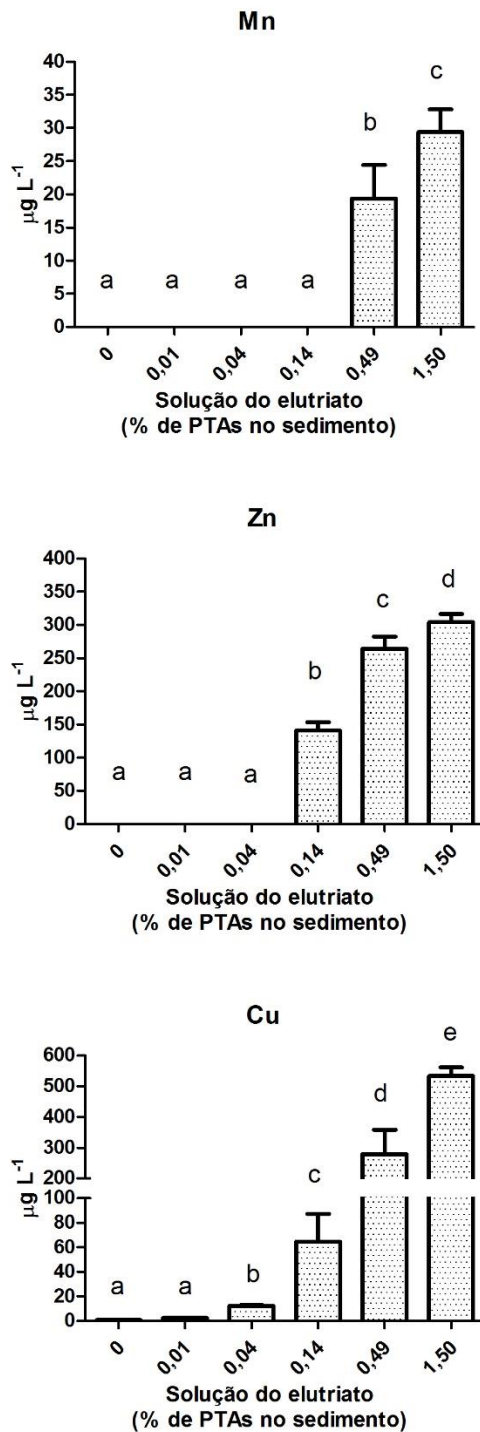


Figura 1: Concentração dos metais Mn, Zn e Cu na solução do elutriato das diferentes porcentagem de PTAs no sedimento. As letras diferentes indicam diferenças significativa dos metais entre os tratamentos.

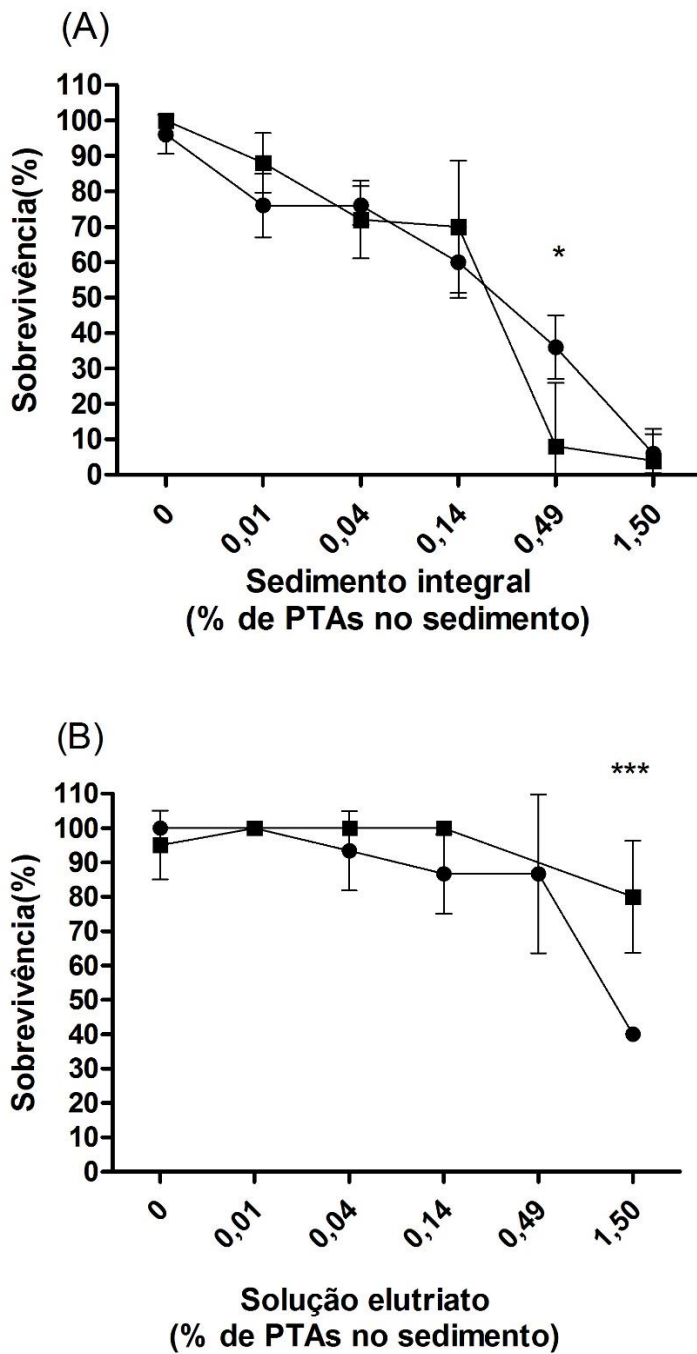


Figura 2: Comparação entre as taxas de sobrevivência dos organismos *Monokalliapseudes schubarti* (quadrados) e *Hyalella azteca* (círculos) nos testes usando sedimento integral (A) e elutriado do sedimento (B). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre a sobrevivência dos organismos na mesma concentração (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$).

Potential toxicity of metals leached from antifouling paint particles under different salinities.

Sanye Soroldoni¹, Samantha Eslava Martins², Italo Braga Castro³, Grasiela Lopes Leães Pinho^{1*}

¹ Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (IO -FURG). Av. Itália s/n, Campus Carreiros, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (ICB – FURG). Av. Itália s/n, Campus Carreiros, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

³ Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo (IMAR-UNIFESP). Av. Almirante Saldanha da Gama, 11030400, Santos, SP, Brazil

Corresponding author: grasielapinho@hotmail.com

Abstract

Antifouling paint particles (APPs) are residues generated during maintenance of vessels. In boat maintenance areas of South America, waste generation and disposal are not completely regulated. Therefore, APPs can enter the aquatic environment and act as a source of contamination by metals and other biocides. Thus, the aim of the present study was to evaluate the potential ecotoxicity of the metal mixture present in APPs leached under different salinities. APP leachates were very toxic to *Acartia tonsa*, reaching an estimated LC₅₀ of 1% at salinities 5 and 15, and 2% at salinity 30. The addition of the chelators, EDTA and sodium thiosulfate, in leachates showed that metals are the major responsible factor for the observed toxicity. Moreover, results from the calculated toxic units suggested a slightly synergic effect between Cu and Zn in the paint formulation. A metal speciation modelling showed that Zn was predominant as a free ion at all salinities, therefore, explaining the high leachate toxicity. Furthermore, the release of Zn was observed more at lower salinities, whereas Cu was observed at higher salinities. APPs are frequently released in estuarine systems, under conditions of salinity gradients. Therefore, navigated estuaries might be under the threat of this neglected residue.

Keywords: Antifouling paint particles, Leachate, Biocides, Metal mixture, Toxicity, *Acartia tonsa*

1. Introduction

Metals such as copper (Cu) and zinc (Zn) are commonly used in antifouling paints as biocides (e.g., Cu and Zn oxides and Cu thiocyanate) to prevent the attachment of organisms such as microalgae, macroalgae, and invertebrates to boats and other structures submersed in salt water (Almeida et al., 2007). In addition, paint formulations might contain several organic and organo-metallic compounds that are used to boost the biocide effects of Cu and Zn (Singh and Turner, 2009a; Yebra et al., 2004). Antifouling paints are designed to slowly release the biocides from the coatings into the water, and they lose their efficiency against bioincrustation over time (Chambers et al., 2006). Thus, antifouling systems should be replaced periodically. The process of boat maintenance results in generation of antifouling paint particles (APPs) due to the removal of the old coating material (Turner, 2010). These particles often reach aquatic environments and can act as secondary contamination sources. Recent studies have identified APPs as a source of metal contamination (Singh and Turner, 2009b; Soroldoni et al., 2017; Turner, 2013; Turner et al., 2014), leaching large amounts of Cu and Zn into aquatic environments (Holmes and Turner, 2009; Jessop and Turner, 2011; Singh and Turner, 2009a). Most boatyards and marinas near the coastal areas of Southern Brazil (Costa et al., 2016) and Southwest England (Turner, 2013) do not follow the correct disposal procedures for the APPs generated during boat maintenance, highlighting the importance of better regulations. This is a relevant problem in the boat-maintenance areas, where waste generation and disposal is not completely regulated. In Brazil, the current regulatory procedure only assesses the correct disposal of paint residues that contain TBT-based antifouling paints (Norman 23). Therefore, the management of booster biocides currently used in paint formulation is not regulated. Around the world, the ship and boat building and repair industry have codes of practice that usually recommend solid waste collection and its correct disposal (British Marine Federation, 2005; Environment Canada, 1995). However, as these documents list general guidelines, correct disposal methods might not be in practice or clearly defined (Srinivasan and Swain, 2007).

As APPs are composed of biocides and other toxic substances such as binders, solvents, and preservatives (Karlsson et al., 2010), it is a challenge to identify chemicals associated with toxicity to non-target organisms. The Toxic Identification and Evaluation (TIE) (USEPA, 2007, 1993) method have been developed for this purpose.

For phase I of the TIE method, complexing agents (CA) such as EDTA and sodium thiosulfate have been successfully used to identify harmful substances responsible for the environmental impact of complex mixtures, mainly metals (Camargo et al., 2014; Poleza et al., 2014; USEPA, 2007, 1993). Thus, adding CA to investigate the toxicity of application in phase I of the TIE method in APP leachates could be very suitable to identify potential toxicity of metals.

Estuarine environments have served as locations for both human settlement and industrial expansion, as well as port development and boat facilities, and thus, act as a sink for trace metals and other hazardous substances, mostly of anthropogenic origin (Xu et al., 2013). In estuarine areas, salinity is one of the main driving factors related to the distribution of metals, with possible effects on their toxicity and speciation (Wright & Welbourn, 2001). Thus, the aim of the present study was to evaluate the potential toxicity of the metal mixture in APPs leached under different salinity conditions.

2. Material and Methods

2.1 Antifouling paint particle production

A sample of the commercial antifouling paint Super Marine AF Ionex MB (Renner®), obtained from a boat maintenance facility in Rio Grande, Brazil, was applied on transparent glass sheets (30 cm × 30 cm), with two applications of paint to reach the recommended thickness according to the manufacturer's technical report (www.rennercoatings.com). After drying, the paint layer was scraped off into a glass flask and about 10 g of antifouling paint particles (APPs) were produced, which were dried and sieved.

2.2 Exposure medium

Leachate solutions were prepared by the addition of 1.25 g APPs in 1 L of artificial saline water, prepared by the addition of artificial salt (Coralife®), yielding three different salinities, i.e., 5, 15, and 30. The leachate was prepared in 7 days according to the methodology proposed by Turner et al. (2008), using mechanical shaking (50 rpm) and controlled temperature (20 ± 2 °C), without illumination. After shaking, the leachate was filtered through a Buchner funnel (3 mm pore). This stock solution was used in bioassays and chemical analyses as described below.

2.3 Bioassays

The euryhaline copepod, *Acartia tonsa*, was obtained from a stock culture maintained at Universidade Federal do Rio Grande. Acute toxicity tests were carried out

using the methodology described in the standard guidelines ISO 14669 (ISO, 1999) at three different salinities (5, 15, and 30). The leachates (exposure solutions) were prepared from the stock solution at the following concentrations: 100%, 45%, 15%, 5%, and 1% of the stock solution in 1 L of artificial saline water at the three, above-mentioned salinities. The tests were performed by adding 10 adult organisms, without sex distinction, in 100 mL of the test and control solutions, with four replicates per treatment. At the end of the exposure time (48 h), the lethal concentration (LC₅₀) at each salinity was calculated. Thereafter, complexing agents (CA) were added to the experimental media (USEPA, 2007), in order to evaluate if the APP toxicity was due to toxic effects of metals in its composition. Copepods were exposed to the previously determined LC₅₀ at each salinity, following the standard guideline ISO 14669 (ISO, 1999), with and without 100 mg L⁻¹ of both CA compounds (EDTA and sodium thiosulfate), resulting in four treatments for each salinity: control (artificial saline water), control plus CA, LC₅₀, and LC₅₀ plus CA.

All tests were carried out at 20 ± 2 °C, with a 12 h light-dark cycle, for 48 h. The living and dead organisms were counted, and the salinity, pH, temperature, and dissolved oxygen were measured in the beginning and end of the experiments.

2.4 Chemical analyses

Leachate dilutions were filtered in 0.45 µm and three 10-mL aliquots were added to individual plastic tubes and acidified with 250 µL of concentrated HNO₃. Dissolved copper (Cu) and zinc (Zn) concentrations were then quantified by Flame Atomic Absorption Spectroscopy. Cu and Zn standards were prepared using a reference solution. Metal speciation calculations were performed using the geochemical speciation model visual MINTEQ. Input data used for salinities 5 and 15 were based on the composition of seawater (Barnes, 1954), and the composition of artificial salt water Coralife was used for salinity 30.

2.5 Statistics

Nominal LC₅₀ was first calculated by Trimmed Spearman Kabber test (Hamilton et al., 1975). The LC₅₀ based on dissolved metal concentration was also estimated based on the percentage effect observed in the tests. For verifying the relationship between toxicity and metals, a Spearman correlation test was used at a significance level of 95%. For the tests using complexing agents, the differences among exposure treatments were

evaluated using one-way ANOVA ($p < 0.05$), followed by Tukey's post hoc test. Differences between the average metal concentrations in each salinity were estimated using two-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by Bonferroni post hoc test. Prior to statistical analyses, the normality and homogeneity of data were verified using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. ANOVA and correlation analysis were performed using the software GraphPad Prism (v 5.02 for Windows, San Diego, USA).

Toxic interactions among metals were characterized by calculating toxic units (TUs) based on LC_{50} estimates from bioassays with mixtures and single metals (Spehar and Fiandt, 1986). TUs were calculated by dividing the LC_{50} estimated from the mixture by the corresponding estimate from the single metal data (from literature). If the sum of TUs equals 1.0 for any single compound, the toxicity is assumed to be simple additive; a more-than-additive toxicity is indicated if the sum of TUs is less than 1.0. If the sum of TUs in a mixture exceeds 1.0, the toxicity of the mixture is indicated as less-than-additive or antagonist (Brown, 1968).

3. Results and Discussion

Antifouling paint particles leachates were very toxic to the copepod *Acartia tonsa*, showing up to 100% mortality at all the salinities tested. The leachates resulted in 100% mortality until 5% dilution, and the calculated LC_{50} were 1% for the salinities 5 and 15 and 2% at salinity 30 (Table 1). Considering the high Cu and Zn contents in Super Marine AF Ionex MB [Cu = 50.4% and Zn = 26.4% (Costa et al., 2016)], the potential toxicity of metals was evaluated by adding complexing agents (CA) to the exposure media. The concentration of CA (100 mg L^{-1}) used in the experiments was not toxic to the organisms, and no significant mortality was observed in the control groups, regardless of the salinity, with or without CA (Fig. 1). Similarly, leachates were not toxic when combined with CA. On the other hand, survival of copepods was severely reduced when the organisms were exposed to the LC_{50} without the addition of CA (Fig. 1).

Both EDTA and sodium thiosulfate strongly decrease Cu toxicity. However, sodium thiosulfate is only weakly effective in reducing Zn toxicity (Hockett and Mount, 1996; Resgalla Jr et al., 2012). Therefore, EDTA and sodium thiosulfate were used together as CA in the present study, resulting in a complete diminishing of the leachate toxicity in *A. tonsa* (Fig. 1). These compounds have been successfully used in the TIE approach to determine if metals are the primary responsible factor for toxicity in

complex mixtures of water and sediments (Burgess et al., 2013; Camargo et al., 2014; Poleza et al., 2014; USEPA, 1993). The decrease in toxicity by the addition of EDTA suggests that cationic metals might be present in the samples at toxic levels. In such a scenario, metals such as Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} are complexed by EDTA (USEPA, 2007). Water chemistry also affects the chelation of metals to CA, which is dependent on the pH, type of metal, the presence of other ligands in the solution, and the affinity of metal with EDTA (Resgalla Jr et al., 2012). Sodium thiosulfate is used in TIE procedures to reduce the toxicity of oxidants such as chlorine, bromine, iodine, and sulphides, and some cationic metals such as Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , and Hg^{2+} (SAIC, 2003).

Dissolved metals were measured in the LC_{50} leachates (Fig. 2) and showed no differences in the Cu concentrations between salinities 5 and 15, whilst both differed significantly from salinity 30. On the other hand, for Zn, the concentrations were significantly different among the salinities tested. Copper and zinc are commonly used in antifouling paint formulations in inorganic forms (oxides) or as organic booster biocides [e.g. Cu/Zn pyrrithiones, zineb (zinc ethane-1,2-diylbis(dithiocarbamate)], and ziram [zinc dimethyl (dithiocarbamate)] (Thomas and Brooks, 2010). Nevertheless, antifouling systems generally contain other compounds (e.g., binders, solvents, preservatives) which might intensify their environmental toxicity (Karlsson et al., 2010). Therefore, the assessment of the toxicity of antifouling paint particle leachates and their mixtures is environmentally relevant. This approach has showed that paints considered “biocide free” were very toxic against the euryhaline copepod *Nitocra spinipes*, the macroalga *Ceramium tenuicorne*, and the bacteria *Vibrio fischeri* (Karlsson et al., 2010; Ytreberg et al., 2010). In these studies, observed toxicity was strongly correlated with the Zn leaching from paint coatings (Karlsson et al., 2010; Ytreberg et al., 2010).

Some studies observed a protective effect of salinity against Cu and Zn toxicity, mainly due to the complexation of free ion metals by organic matter, chlorides, and hydroxides, and competition with cations such as Mg^{2+} and Na^+ (Niyogi et al., 2016; Pinho et al., 2007; Pinho and Bianchini, 2010). This protective effect of salinity was observed in *A. tonsa* exposed to Cu (Pinho and Bianchini, 2010) and *Tigriopus japonicus* exposed to Cu and Zn (Park et al., 2014). Results of the present study also

verified this protective effect, during comparison of metal concentrations with respect to their 48 h-LC₅₀ at different salinities (Fig. 2).

To better understand why leached compounds from APPs are more toxic in a mixture, some studies have investigated the toxicity of single biocide compounds to *A. tonsa*. The reported toxicity of Zn for *A. tonsa* at salinity 30 was 860 µg Zn L⁻¹ (96 h-LC₅₀) and 191 µg Zn L⁻¹ (48 h-LC₅₀) (Alvez, 2011; Ihara et al., 2010). Similarly, the toxicity of Cu (48 h-LC₅₀) to *A. tonsa*, as reported by Monteiro et al. (2013), was 41.8, 67.4, and 108.7 µg L⁻¹, respectively, at salinities 5, 15, and 30. Our results (Fig. 2) showed that lower concentrations of metals leached from APPs caused the acute toxicity (LC50) found in the present study, and it might be attributed to synergic effects of Cu and Zn in the antifouling paint formulation.

In fact, TUs for salinity 30 were estimated at 0.59 for Cu and 0.3 for Zn [single toxicity values were extracted from Monteiro et al. (2013) and Alvez (2011)], resulting in ΣTU = 0.89, TU suggested a slightly synergic effect of the interactions between Cu and Zn in the paint formulation, as the sum of TUs was less than 1.0 (Brown, 1968). For other salinities (5 and 15), data on Zn single toxicity were not found in literature to calculate TU. In freshwater systems, a binary mixture of Cu-Zn produced additive or slightly synergic effects in the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* (Cooper et al., 2009) and *Daphnia magna* (Meyer et al., 2015) and a synergic effect in the cladoceran *D. carinata* and the fish *Pimephales promelas* (Lynch et al., 2016). Under marine conditions, however, a study has shown a slightly antagonistic effect of Cu-Zn mixture in the sea-urchin *Evechinus chloroticus* (Rouchon and Phillips, 2016). Results suggest that the toxicity of Super Marine is mostly caused by metals (Fig. 1), but other components in the paint formulation might be influencing the interaction between Cu and Zn, resulting in synergism. Further studies are needed to elucidate the processes that underlie the interactions among the compounds in complex formulations such as antifouling paints, once they reach the aquatic ecosystems.

As metals reach coastal environments, the water properties determine the distribution, speciation, and destination of these compounds, which, in turn, govern their bioavailability. Overall, metal ionic species, such as Cu²⁺ and Zn²⁺, are the ones associated with toxic responses in organisms (Hall & Anderson, 1999, De Schamphelaere et al., 2002, Paquin et al., 2002). In the present study, modelling of metal speciation showed that, at salinities 5 and 30, CuCO₃ appears as the dominant Cu

species in leachate dilution, at 37.5% and 57.0%, respectively, while Zn speciation showed the free ion Zn^{2+} as the predominant form at these salinities, at 46.3% and 41.9%, respectively. On the other hand, at salinity 15, both Cu and Zn were predominant as free ions, at 33.7% and 44.4%, respectively. These results suggest that Cu has a higher affinity to seawater anions than Zn, the latter being in its most toxic form at all salinities. Therefore, at salinity 5, Zn speciation might explain the toxicity of the leachate. The most common explanation for the increase in the toxicity of metals is the reduction in chlorine that results in less abundance of the chloro-complex and bioavailable form (free ion) (Verslycke et al., 2003). Recently, Niyogi et al. (2016) observed that the availability of Zn in seawater is mainly regulated by the complexation of Zn with inorganic anions, particularly Cl^- and OH^- . In addition, for Cu, complexation by dissolved organic matter and inorganic ions increases as salinity increases, and thus, less unbounded Cu is available, decreasing its accumulation and toxicity (Pinho and Bianchini, 2010). Meyer et al. (2015) hypothesized that the dominant process determining acute toxicity in the binary Cu-Zn mixture is the metal-metal competition for the binding sites of dissolved organic matter, resulting in a higher concentration of Cu^{2+} and/or Zn^{2+} , than would be expected for single Cu and Zn tests at the same exposure concentrations of dissolved Cu and Zn. These authors also suggest that the increase in free ion concentrations in exposure water drives the binding of metals to organisms, which explains the more-than-additive toxicity of binary metal mixtures. However, the present study used artificial seawater, which is unlikely to contain significant amounts of DOC to drive such chemical reactions (Table 2). In addition, it must be pointed out that other water chemistry parameters might affect metal speciation. As salinity increased, a well-marked augmentation in the pH values occurred at salinity 30 (Table 2), which was also observed in other studies (Niyogi et al., 2016; Pinho and Bianchini, 2010). Speciation of Cu and Zn is highly affected by the pH (Wright & Welbourn, 2001). These results become very important as estuarine environments are undergoing salinity and pH fluctuations that significantly affect metals dynamics, fate, and transport in these areas.

Leaching of metals from Super Marine AF Ionex MB was simulated by the quantification of Cu and Zn in the different leachate dilutions (Fig. 3). The results agreed with the toxicity results for zinc, as Zn dissolution was higher at salinity 5 for all leachate concentrations associated with 100% mortality ($> 4\%$). On the other hand, Cu

showed opposite behaviour leaching more in salinity 30. These results are in accordance with Singh and Turner (2009a), who showed that the conditions supporting Cu and Zn dissolution are high salinity and low salinity, respectively. According to the safety datasheet of the product, the antifouling paint Super Marine contains 15%–25% of zinc oxide and 30%–40% of copper oxide. In fact, dissolved Cu and Zn were found in the water samples, supporting the fact that these metals have been released from the APPs during the exposure time (Fig. 3). The reactions controlling the dissolution of Cu and Zn pigments from antifouling paints in aqueous solutions have been reported by a few studies (Omae, 2003; Yebra et al., 2004), which suggest that Zn dissolution is not affected by the concentration of NaCl. On the other hand, Cu dissolution is dependent on chloride concentration, which promotes Cu release along the entire estuary salinity gradient (Singh and Turner, 2009a). When the relationship between toxicity and the presence of metals was assessed, a strong positive correlation between the total dissolved metal concentration and toxicity were observed at salinities 5 and 15 ($R = 0.9411$; $p = 0.0167$), and 30 ($R = 0.8452$; $p = 0.0333$). High Cu and Zn contents were found in an antifouling paint from the same brand as Supermarine AF Ionex (Costa et al., 2016), and although the concentration of Cu was higher than Zn (Cu = 50.4% and Zn = 26.4%) the metals leaching, as discussed above, is expected to be governed by water salinity.

APPs are harmful residues that are frequently released into estuarine systems (Thomas et al., 2002; Turner, 2013, 2010), where harbours, marinas, and boatyards are installed. The present study showed that the occurrence of APPs in estuaries under a salinity gradient might act as a source of metal addition to water, and consequently, to sediment layers. In addition, toxic effects resulting from APP exposure were detected for the tested salinity range (5–30), suggesting that navigated estuaries might be under the threat of this neglected residue. Therefore, special attention is needed towards the release of APPs into aquatic systems, as these residues still contain considerable concentrations of metals that are capable of causing deleterious effects to aquatic organisms (Eklund et al., 2014; Soroldoni et al., 2017; Tolhurst et al., 2007).

4. Conclusion

APP leachates were very toxic to the euryhaline copepod, *A. tonsa*, and the Cu-Zn mixture presented a slight synergic interaction. Salinity affected the toxicity of the mixture since the LC₅₀ values were the highest at salinity 30. In addition, the toxicity was strongly related to the metals present as biocides and/or booster biocides, as the toxicity was expressively reduced by adding complexing agents. Salinity also affected metal release, resulting in a greater Zn release into the water at lower salinities, and Cu at higher salinities. These results highlight the importance of correct disposal of antifouling paint residues, which can act as a source of metals in estuarine systems, and pose toxicity to estuarine organisms inhabiting boat maintenance facilities vicinity.

Acknowledgments

S. Soroldoni is PhD candidate at Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG) sponsored by CAPES. This research was supported by CNPq (Project 481267/2013-1) and FINEP (Project 672-PO-14-AIBRASIL). I.B. Castro was sponsored by CNPq (PQ 306486/2015-6).

5. References

- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings*. doi:10.1016/j.porgcoat.2007.01.017
- Alvez, M.L., 2011. Toxicidade de misturas de metais para o copépodo eurialino *Acartia tonsa*. Curso de Toxicologia Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 25 p.
- British Marine Federation, 2005. Environmental code of practice: Practical advice for marine businesses, sailing clubs and training centres.
- Barnes, H., 1954. Some Tables for the Ionic Composition of Sea Water. *J. Exp. Biol.* 31, 582–588.
- Burgess, R.M., Ho, K.T., Brack, W., Lamoree, M., 2013. Effects-Directed Analysis (EDA) and Toxicity Identification Evaluation (TIE): Complementary but Different Approaches for Diagnosing Causes of Environmental Toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1935–1945. doi:10.1002/etc.2299
- Camargo, J.B.D.A., Cruz, A.C.F., Campos, B.G., Araújo, G.S., Fonseca, T.G., Abessa, D.M.S., 2014. Use, development and improvements in the protocol of whole-sediment toxicity identification evaluation using benthic copepods. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.10.015
- Chambers, L.D., Stokes, K.R., Walsh, F.C., Wood, R.J.K., 2006. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surf. Coatings Technol.* doi:10.1016/j.surfcoat.2006.08.129
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., Kumar, A., 2009. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1523–1528. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.03.002
- Costa, L.F.D., Mirlean, N., Wasserman, J.C., Wallner-Kersanach, M., 2016. Variability

- of labile metals in estuarine sediments in areas under the influence of antifouling paints, southern Brazil. *Environ. Earth Sci.* doi:10.1007/s12665-016-5355-5
- Eklund, B., Johansson, L., Ytreberg, E., 2014. Contamination of a boatyard for maintenance of pleasure boats. *J Soils Sediments.* doi:10.1007/s11368-013-0828-6
- Environment Canada, 1995. Best Management Practices (BMPs) for Ship and Boat Building and Repair Industry in British Columbia to PCA Consultants Ltd. Vancouver.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R. V, 1975. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays.
- Hockett, J.R., Mount, D.R., 1996. Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity 15, 1687–1693.
- Holmes, L., Turner, A., 2009. Leaching of hydrophobic Cu and Zn from discarded marine antifouling paint residues: Evidence for transchelation of metal pyridiones. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2009.06.018
- Hong, Y.S., Kinney, K.A., Reible, D.D., 2011. Effects of cyclic changes in pH and salinity on metals release from sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1775–1784. doi:10.1002/etc.584
- Ihara, P.M., Pinho, G., Fillmann, G., 2010. Avaliação do Copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 27–32. doi:10.5132/jbse.2010.01.005
- ISO 14669, 1999. Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (copepoda, crustacea). Geneva, International Organization for Standardization, 16p.
- Jessop, A., Turner, A., 2011. Leaching of Cu and Zn from discarded boat paint particles into tap water and rain water. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.021
- Karlsson, J., Ytreberg, E., Eklund, B., 2010. Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. *Environ. Pollut.* 158, 681–687. doi:10.1016/j.envpol.2009.10.024
- Lynch, N.R., Hoang, T.C., O'Brien, T.E., 2016. Acute toxicity of binary-metal mixtures of copper, zinc, and nickel to *Pimephales promelas*: evidence of more-than-additive effect 35, 446–457. doi:10.1002/etc.3204
- Meyer, J.O.S., RAnville, J.A.F., POntasch, M.A., GORsuch, J.O.W., ADams, W.I.J., 2015. Metal Mixture Modeling Evaluation Cd, Cu, AND Zn To *Daphnia magna* 34, 799–808. doi:10.1002/etc.2787
- Monteiro, S.C.R., Pinho, G.L.L., Hoffmann, K., Barcarolli, I.F., Bianchini, A., 2013. Acute Waterborne Copper Toxicity to the Euryhaline Copepod *Acartia Tonsa* at Different Salinities: Influence of Natural Freshwater and Marine Dissolved Organic Matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1412–1419. doi:10.1002/etc.2197
- Niyogi, S., Blewett, T.A., Gallagher, T., Fehsenfeld, S., Wood, C.M., 2016. Effects of salinity on short-term waterborne zinc uptake, accumulation and sub-lethal toxicity in the green shore crab (*Carcinus maenas*). *Aquat. Toxicol.* 178, 132–140. doi:10.1016/j.aquatox.2016.07.012
- Omae, I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives 81–105. doi:10.1002/aoc.396
- Pinho, G., Bianchini, A., 2010. Acute Copper Toxicity in the Euryhaline Copepod *Acartia Tonsa*: Implications for the Development of an Estuarine and Marine Biotic Ligand Model. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1834–1840. doi:10.1002/etc.212

- Pinho, G., Pedroso, M., Rodrigues, S., Souza, S., Bianchini, A., 2007. Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure*. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.001
- Poleza, F., Souza, R.C., Jr, C.R., 2014. Identification of the toxic constituents of sediments in a Brazilian subtropical estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 1–9. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.046
- Resgalla Jr, C., Poleza, F., Souza, R.C., Máximo, M. V, Radetski, C.M., 2012. Evaluation of effectiveness of EDTA and sodium thiosulfate in removing metal toxicity toward sea urchin embryo-larval applying the TIE. *Chemosphere* 89, 102–107. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.04.033
- Rouchon, A.M., Phillips, N.E., 2016. Acute toxicity of copper, lead, zinc and their mixtures on the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 8330, 1–23. doi:10.1080/00288330.2016.1239643
- SAIC, 2003. Guide for planning and conducting sediment pore water toxicity identification evaluations (TIE) to determine causes of acute toxicity at navy aquatic sites. Newport, Rhode Island.
- Singh, N., Turner, A., 2009a. Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2008.10.003
- Singh, N., Turner, A., 2009b. Trace metals in antifouling paint particles and their heterogeneous contamination of coastal sediments. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2008.11.014
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í.B., Duarte, F.A., Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *J. Hazard. Mater.* 330, 76–82. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.02.001
- Spehar, R.L., Fiandt, J.T., 1986. Acute and chronic effects of water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 917–931. doi:10.1002/etc.5620051008
- Srinivasan, M., Swain, G.W., 2007. Managing the use of copper-based antifouling paints. *Environ. Manage.* doi:10.1007/s00267-005-0030-8
- Thomas, K. V, Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*. doi:10.1080/08927010903216564
- Thomas, K. V., McHugh, M., Waldock, M., 2002. Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: Inputs, occurrence and environmental fate. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/S0048-9697(01)01153-6
- Tolhurst, L.E., Barry, J., Dyer, R.A., Thomas, K. V., 2007. The effect of resuspending sediment contaminated with antifouling paint particles containing Irgarol 1051 on the marine macrophyte *Ulva intestinalis*. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.005
- Turner, A., 2013. Metal contamination of soils, sediments and dusts in the vicinity of marine leisure boat maintenance facilities. *J. Soils Sediments*. doi:10.1007/s11368-013-0686-2
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Turner, A., Comber, S., Rees, A.B., Gkiokas, D., Solman, K., 2014. Metals in boat paint fragments from slipways, repair facilities and abandoned vessels: An evaluation using field portable XRF. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.012
- Turner, A., Fitzer, S., Glegg, G.A., 2008. Impacts of boat paint chips on the distribution and availability of copper in an English ria. *Environ. Pollut.*

- doi:10.1016/j.envpol.2007.02.007
- USEPA, 1993. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity.
- Verslycke, T., Vangheluwe, M., Heijerick, D., De, K., Sprang, P. Van, Janssen, C.R., 2003. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea : Mysidacea) under changing salinity. *Aquat. Toxicol.* 64, 307–315. doi:10.1016/S0166-445X(03)00061-4
- Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coatings.* doi:10.1016/j.porgcoat.2003.06.001
- Ytreberg, E., Karlsson, J., Eklund, B., 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Sci. Total Environ.* 408, 2459–2466. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.02.036
- USEPA, 2007. Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I , II , and III Guidance Document.
- USEPA, 1993. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity.
- Xu, B., Burnett, W., Dimova, N., Diao, S., Mi, T., Jiang, X., Yu, Z., 2013. Hydrodynamics in the Yellow River Estuary via radium isotopes: Ecological perspectives. *Cont. Shelf Res.* 66, 19–28. doi:10.1016/j.csr.2013.06.018
- Wright, D. A., Welbourn, P., 2001. *Environmental toxicology*, first ed., Cambridge University Press

Figures

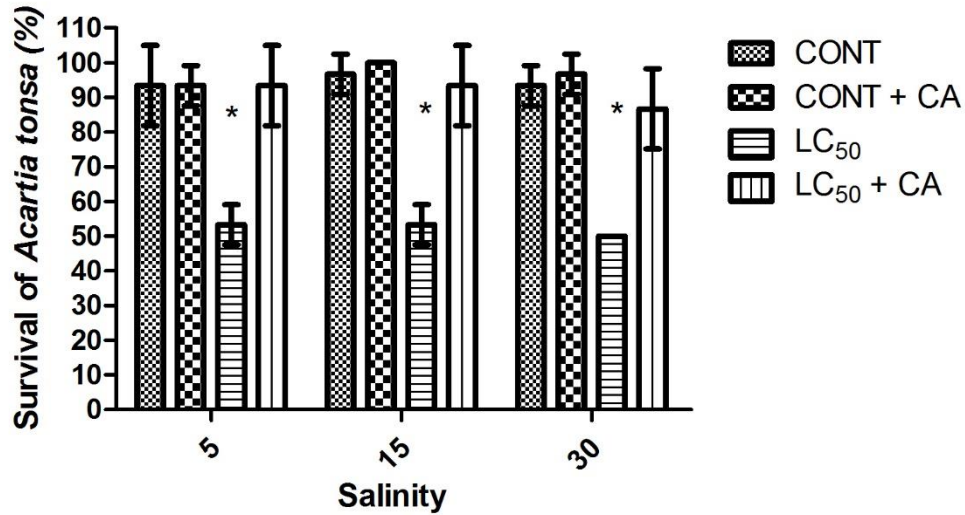


Figure 1: Survival of *Acartia tonsa* exposed to LC₅₀ of leachate at each salinity, with and without the addition of complexing agents (CA). Data are expressed as mean and standard deviation of *A. tonsa* survival (n = 40). Asterisks (*) indicate a significant difference among the treatments at each salinity (p < 0.001).

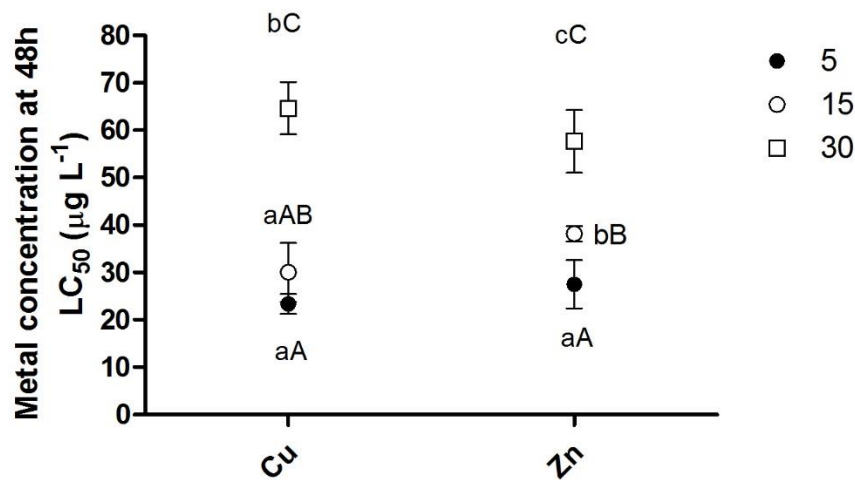


Figure 2: The effect of metal concentrations at 48 h LC ($\mu\text{g L}^{-1}$) on the euryhaline copepod, *Acartia tonsa*, for a wide range of salinities: 5 (solid circles), 15 (open circles), and 30 (open squares). Data are expressed as mean \pm standard deviation. Different lowercase letters indicate significant differences among the salinities for the same metal. Different capital letters indicate significant differences between the metals for the same salinity.

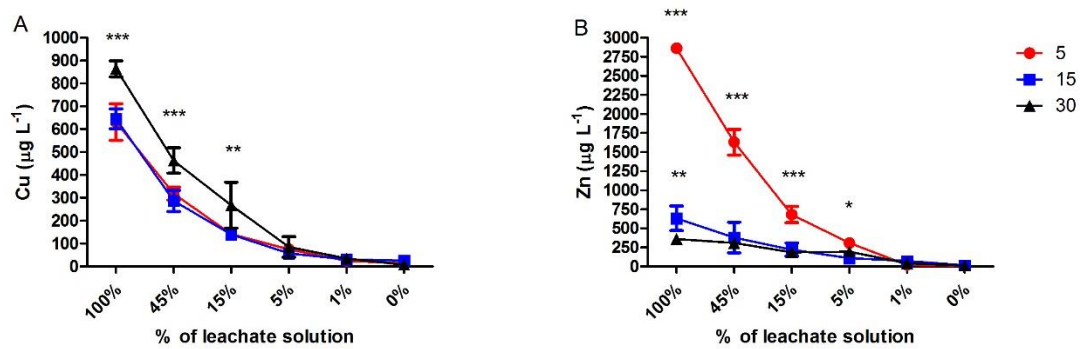


Figure 3: Concentrations of Cu (A) and Zn (B) at each % leachate dilution under three different salinities: 5 (circles), 15 (squares), and 30 (triangle). Different symbols indicate significant statistical difference among the salinities, for the same % of the leachate solution (*p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001).

Table 1: Mortality and calculated LC50 of *Acartia tonsa* exposed in different dilution of APPs leachate. Values were expressed as total number of organisms used in experiments.

% Leachate	Salinity		
	5	15	30
100%	40	40	40
45%	40	40	40
15%	40	40	40
5%	37	39	40
1%	19	17	4
0% (control)	5	1	0
Calculated LC50	1%	1%	2%

Table 2: Physicochemical characteristics of artificial salt water used in the experiments.

Parameters	Salinity		
	5*	15*	30**
pH	7.14	7.45	7.98
Temperature	21.5	20.2	19.4
Dissolved Oxygen (mg L ⁻¹)	7.45	7.52	7.48
Na ⁺ (mmol L ⁻¹)	72.48	193.3	464
K ⁺ (mmol L ⁻¹)	1.535	4.093	9.3
Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	8.33	22.07	63.00
Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	1.9	4.4	9.3
Cl ⁻ (mmol L ⁻¹)	84.5	225.4	566
SO ₄ ²⁻ (mmol L ⁻¹)	4.41	11.65	15.00
Dissolved Organic Carbon (DOC) (mg L ⁻¹)**	0.009	0.018	0.018
Alkalinity (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	40	75	75

*Sea water ionic composition according to Barnes (1954)

** Ion concentration and DOC (based on TOC content) data from Coralife seasalt datasheet.

Capítulo VII: Síntese da discussão e conclusões

A presente tese teve por objetivo geral avaliar a problemática ambiental relacionada com a presença de partículas de tintas anti-incrustantes (PTAs) no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos (LP). A presença desses resíduos em sedimentos próximos às áreas costeiras do Reino Unido e Suécia, a falta de regulações adequadas sobre a geração e disposição final desses resíduos no Brasil, bem como o desconhecimento sobre a situação das PTAs em toda a América Latina, foram as principais motivações para a investigação do problema em uma área costeira brasileira. No estuário da LP, além do Porto de Rio Grande contar com um grande tráfego de embarcações, existem várias áreas de manutenção de embarcações ao longo de suas margens, as quais são potenciais candidatas a fontes desse resíduo para o ambiente adjacente.

O primeiro artigo da presente tese teve como objetivo principal, portanto, investigar as fontes, a ocorrência, a composição química e a dinâmica ambiental das PTAs. Dez áreas no entorno do estuário da LP foram identificadas como geradoras de PTAs, dentre elas uma marina, estaleiros de pequeno e médio porte e portos pesqueiros. Além disso, uma estimativa do uso de tintas anti-incrustantes baseada na quantidade de barcos reparados demonstrou que as colônias de pesca artesanal da região são as principais fontes potenciais de PTAs. De acordo com as análises realizadas em amostras obtidas em cada área, confirmou-se que as PTAs geradas na região foram altamente heterogêneas em formato e tamanho. Essa diferença foi atribuída as diferentes técnicas empregadas para a retirada dos sistemas anti-incrustantes antigos. Adicionalmente, a variada composição observada, reflete o uso de diferentes marcas de tintas anti-

incrustantes pelas embarcações que trafegam na região. Além disso, mesmo após o seu uso e desgaste no casco das embarcações, as PTAs apresentam concentrações significativas dos metais cobre (Cu) e zinco (Zn) utilizados como biocidas nesses produtos, assim como dos co-biocidas Irgarol 1051, Diuron e DCOIT. Portanto, sem uma destinação correta, esses resíduos têm como destino final o sedimento estuarino, gerando “hot spots” de contaminação desses compostos. Este cenário foi observado no sedimento coletado próximo à área de manutenção da marina estudada, devido a presença de altas concentrações do composto DCOIT, além dos metais Cu e Zn nas amostras de sedimentos. Em algumas das áreas sob a influência de estaleiros e marina a presença de PTAs nos sedimentos variou de 0,01 a 4%. A mobilidade ambiental das PTAs também foi investigada, e características como tamanho e densidade, bem como a hidrodinâmica da área em que as PTAs são originalmente depositadas no ambiente demonstraram ter forte influência sobre sua dinâmica. Nesse sentido, áreas de baixa hidrodinâmica favorecem a deposição das PTAs nos sedimentos próximos à área de manutenção, diminuindo então seu transporte. Enquanto que áreas com elevada hidrodinâmica não apresentaram níveis mensuráveis de PTAs nas amostras de sedimentos provavelmente devido a sua exportação para fora do estuário. Portanto, com base nos resultados obtidos, as PTAs representam um problema para a região estuarina da LP e possivelmente para outros estuários sul-americanos onde a atividade naval é intensa. Parte desse problema é devido à falta de legislação e fiscalização no que tange à disposição desse perigoso resíduo, que vem sendo até o momento negligenciado. Com base nas observações descritas nesse artigo, ficou evidente a necessidade de avaliar os possíveis efeitos que as PTAs podem produzir sobre organismos estuarinos.

Portanto, o segundo artigo desta tese, avaliou a toxicidade aguda e crônica de sedimentos contaminados por PTAs sobre o copépodo eurialino *Nitokra sp.* O

sedimento integral fortificado com PTAs apresentou toxicidade crônica, comprometendo a reprodução dos copépodos, enquanto o elutriato do sedimento apresentou toxicidade aguda com uma CL_{50} de 0,14% de PTAs no sedimento. Essa alta toxicidade foi devido principalmente a presença dos metais Cu e Zn e do co-biocida DCOIT, os quais foram provavelmente liberados para o meio de exposição durante os ensaios. Portanto, considerando as concentrações de PTAs detectadas (0 – 4%) em sedimentos naturais da LP e descritas no estudo anterior, os níveis que produzem efeitos deletérios sobre o copépode *Nitokra sp* são realistas do ponto de vista ambiental. Essa observação reforça a importância da implementação de regulações e fiscalização nas áreas de manutenção de embarcações para a correta destinação desses resíduos, visto que os organismos que vivem em regiões sob a influência de áreas de manutenção de embarcações estão sob o risco da contaminação por PTAs no sedimento próximo a essas áreas.

Considerando que concentrações ambientalmente relevantes de PTAs são capazes de causar toxicidade aguda e crônica para um representante da fauna bentônica, o terceiro artigo visou investigar se o tipo de interação organismo-sedimento influencia a toxicidade de sedimentos contaminado por PTAs. Para isso, foram utilizados como organismos teste duas espécies de microcrustáceos que interagem de forma diferente com os sedimentos: a *Hyaella azteca*, um anfípoda epibentônico que vive na interface sedimento-água; e o *Monokalliapseudes schubarti*, um tanaidáceo infaunal que escava o sedimento e constrói tubos em forma de U. Quando expostos ao elutriato (fase aquosa do sedimento), o *M. schubarti* mostrou-se mais resistente aos contaminantes lixiviados do que *H. azteca*. Nestes experimentos os organismos se encontravam nas mesmas condições de exposição. Porém, quando os testes foram realizados usando sedimentos enriquecidos com PTAs, foi observada toxicidade aguda para ambas espécies.

Entretanto, nesse experimento, o tanaidáceo *M. schubarti* mostrou-se mais sensível do que o anfípoda *H. azteca*. Essa maior sensibilidade foi relacionada com a maior interação organismo-sedimento dessa espécie, tornando-o mais susceptível aos compostos lixiviados a partir das PTAs nesse compartimento. Além disso, os tanaidáceos expostos às maiores concentrações de PTAs apresentaram um comportamento de fuga do sedimento, não sendo observada a construção dos tubos pelos organismos. Portanto, os resultados apresentados nesse artigo reforçam o fato das PTAs estarem atuando como fontes contínuas de contaminantes para o sedimento estuarino e indica a interação organismo-sedimento como um fator importante na toxicidade das PTAs.

Como portos, marinas e estaleiros estão frequentemente instalados em áreas estuarinas, a investigação do papel da salinidade na toxicidade das PTAs descartadas indevidamente, foi avaliada em testes de laboratório apresentados no quarto artigo. Além disso, foi abordado o potencial tóxico dos metais lixiviados pelas PTAs, sua ação tóxica conjunta e especiação em diferentes salinidades. O lixiviado das PTAs apresentou alta toxicidade para o copépodo *Acartia tonsa* ao longo da variação de salinidade testada (5 – 30), sendo observado um efeito ligeiramente sinérgico da mistura do lixiviado, principalmente, pela ação dos metais Cu e Zn. De fato, esses elementos são utilizados com esse propósito nas formulações das tintas anti-incrustantes. A adição dos quelantes EDTA e Tiosulfato de sódio confirmaram que os metais são os principais responsáveis pela toxicidade observada. Portanto, os resultados desse artigo demonstram que a variação salina dos ambientes estuarinos é um fator importante no que se refere a toxicidade das PTAs, sendo os metais os principais responsáveis por essa toxicidade.

Por fim, a análise integrada dos dados gerados, indica que a presente tese apresentou um panorama inédito da problemática relacionada a presença de PTAs no estuário da Lagoa dos Patos. Dessa forma, foi confirmado que esses resíduos, até o momento negligenciados, na zona costeira da América Latina, representam um risco ambiental para sistemas estuarinos navegados da região, sendo esse risco potencializado pela falta de legislação e fiscalização sobre o manejo e disposição correta de PTAs em áreas de manutenção de embarcações, principalmente de menor porte. Considerando a grande importância ecológica do estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, dados, até o momento inexistentes, quanto a fontes e exposição dos organismos às PTAs são importantes para que uma avaliação de risco ecológico relacionada a presença desse resíduo nos ambientes costeiros sul-americanos seja realizada. Os resultados apresentados na presente tese, portanto, são um gatilho inicial para que sejam realizadas avaliações de risco ecológicos completas para a região de estudo, já que foram atingidos alguns passos importantes para tal, tais como: identificação dos efeitos adversos e avaliação das doses ambientais as quais os organismos estão expostos.

Capítulo VIII: Referências

Bibliográficas

Abbot A, Abel PD, Arnold DW, Milne A (2000) Cost-benefit analysis of the use of TBT: the case for a treatment approach. *Sci. of the Total Environ.* doi: 10.1016/S0048-9697(00)00505-2

ABNT (2007) NBR 15470 - Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade em Sedimento - Método de ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda).

Abreu, FEL (2014) Biocidas de terceira geração em sedimentos superficiais da costa brasileira. Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande. 104 p.

Almeida E, Diamantino TC, de Sousa O (2007) Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings.* doi:10.1016/j.porgcoat.2007.01.017

British Marine Federation (2005) Environmental code of practice: Practical advice for marine businesses, sailing clubs and training centres

Castro ÍB., Westphal E, Fillmann G (2011) Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. *Quim. Nova.* doi:10.1590/S0100-40422011000600020

Champ MA (2003) Economic and environmental on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Mar. Pollut. Bull.* doi: 10.1016/S0025-326X(03)00106-1

Costa LFD, Mirlean N, Wasserman JC, Wallner-Kersanach M (2016) Variability of labile metals in estuarine sediments in areas under the influence of antifouling paints, southern Brazil. *Environ. Earth Sci.* doi:10.1007/s12665-016-5355-5

Costa LDF, Wallner-Kersanach M (2013) Assessment of the labile fractions of copper and zinc in marinas and port areas in Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* doi: 10.1007/s10661-013-3063-0

Eklund B, Johansson L, Ytreberg E (2014) Contamination of a boatyard for maintenance of pleasure boats. *J Soils Sediments.* doi:10.1007/s11368-013-0828-6

Environment Canada (1995) Best Management Practices (BMPs) for Ship and Boat Building and Repair Industry in British Columbia to PCA Consultants Ltd. Vancouver

Fernandes EHL, Dyer KR, Moller OO, Niencheski LFH (2002) The Patos Lagoon hydrodynamics during an El Niño event (1998). *Cont. Shelf. Res.* 22, 1699–1713

Gammon M, Turner A, Brown MT (2009) Accumulation of Cu and Zn in discarded antifouling paint particles by the marine gastropod, *Littorina littorea*. *Estuar. Coast. and Shelf Sci.* doi: 10.1016/j.ecss.2009.07.009

Godoi AFL, Favoreto R, Santiago-Silva M (2003) Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. *Quim. Nova.* doi: 10.1590/S0100-40422003000500015

Graceli JB, Sena GC, Lopes PFI, Zamprogno GC, Costa MB, Godoi AFL, Santos DM, Marchi MRR, Fernandez MAS (2010) Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate, *Reprod. Toxicol.* doi:10.1016/j.reprotox.2012.11.008

Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R. V, 1975. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays

Harino H, Arifin Z, Rumengan IFM, Arai T, Ohji M, Miyazaki N (2012) Distribution of antifouling biocides and perfluoroalkyl compounds in sediments from selected locations in Indonesian coastal waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 13–21. doi:10.1007/s00244-011-9747-y

Hasan CK, Turner A, Readman J, Frickers T (2014) Environmental Risks Associated with Booster Biocides Leaching from Spent Anti-Fouling Paint Particles in Coastal Environments. *Wat. Environ. Res.* 86, 2330–2337. doi:10.2175/106143014X14062131178835

Holmes L, Turner A (2009) Leaching of hydrophobic Cu and Zn from discarded marine antifouling paints residues: Evidence of transchelation of metal pyridiones. *Environ. Pollut.* doi: 10.1016/j.envpol.2009.06.018

ISO 14669 (1999) Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (copepoda, crustacea). Geneva, International Organization for Standardization, 16p

Jessop A, Turner A (2009) Leaching of Cu and Zn from discarded boat paint particles into tap water and rain water. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.021

Kalikoski DC, Vasconcellos M (2013) Estudo das condições técnicas, econômicas e ambientais da pesca de pequena escala no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil: Uma metodologia de avaliação. *FAO, Circular de Pesca e Aquicultura n. 1075.* Roma, FAO, 200 pp

Kjerfve B (1986) Comparative oceanography of coastal lagoons, p. 63–81. In D. A. Wolfe (ed.), *Estuarine Variability.* Academic Press, New York

Kennish MJ (1991) *Ecology of estuaries: Anthropogenic effects,* CRC Press, Florida.

Lotufo GR, Abessa DMS (2000) Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos, in: Nascimento IA, Souza

ECPM, Nipper MG, Métodos de Ecotoxicologia Marinha: aplicações no Brasil, Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, pp.151-162

Martinez K, Barceló D (2001) Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means ultrasonic extraction and HPLC – APCI – MS, Fresenius J. Anal. Chem. 370 - 940-945

Moller OO, Castaing P, Salomon JC, Lazure P (2001) The Influence of Local and Non-local Forcing Effects on the Subtidal Circulation of Patos Lagoon. Estuaries 275–289

Okamura H, Aoyama I, Liu D, Maguire RJ, Pacepavicius, GJ, Lau, YL (2000) Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. Wat. Res. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00095-6

Omae I (2003) Organotin antifouling paints and their alternatives. Appl. Organometal. Chem. 81–105. doi:10.1002/aoc.396

Organização Marítima Internacional (2008) Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. <http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions>

Parks R, Donnier-Marechal M, Frickers PE, Turner A, Readman JW (2010) Antifouling biocides in discarded marine paint particles. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.03.022

Rees AB, Turner A, Comber S (2014) Metal contamination of sediment by paint peeling from abandoned boats, with particular reference to lead. Sci.of Total Environ. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.064

Seeliger U, Odebrecht C (2010) O estuário da Lagoa dos Patos: Um século de transformações. 1ª edição. FURG, Rio Grande, 180 p

Silva SV (2015) Avaliação da toxicidade das partículas de tintas anti-incrustantes para organismos bentônicos. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande – FURG, 43 p

Singh N, Turner A, (2009a) Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. Environ. Pollut. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.003

Singh N, Turner A (2009b) Trace metals in antifouling paint particles and their heterogeneous contamination of coastal sediments. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.11.014

Takahashi CK, Turner A, Millward GE, Glegg GA (2012) Persistence and metallic composition of paint particles in sediments from a tidal inlet. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.10.010

Thomas KV, McHugh M, Hilton M, Waldock M (2003) Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. Environ. Pollut. doi:10.1016/S0269-7491(02)00343-3

Thomas KV, McHugh M, Waldo M (2002) Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Sci of Total Environ.* doi: 10.1016/S0048-9697(01)01153-6

Thomas KV, Brooks S (2010) The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling.* doi:10.1080/08927010903216564

Turner A (2013) Metal contamination of soils, sediments and dusts in the vicinity of marine leisure boat maintenance facilities. *J. Soils Sediments.* doi:10.1007/s11368-013-0686-2

Turner A (2010) Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004

Turner A, Comber S, Rees AB, Gkiokas D, Solman K (2014) Metals in boat paint fragments from slipways, repair facilities and abandoned vessels: An evaluation using field portable XRF. *Talanta.* doi:10.1016/j.talanta.2014.08.012

Turner A, Radford A (2010) Bioaccessibility of trace metals in boat paint particles. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.02.022

Turner A, Pollock H, Brown MT (2009) Accumulation of Cu and Zn from antifouling paint particles by the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2009.03.026

Turner A, Fitzer S, Glegg GA (2008) Impacts of boat paint chips on the distribution and availability of copper in an English ria. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2007.02.007

USEPA (2001) *Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual.* Washington, DC., pp. 1–16

USEPA (1997) *Profile of the shipbuilding and repair industry.* EPA 310-R97-008. Washington DC

Turner A, Fitzer S, Glegg GA (2008) Impacts of boat paint chips on the distribution and availability of copper in an English ria. *Environ. Pollut.* doi: 10.1016/j.envpol.2007.02.007

Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K (2004) Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coatings.* doi:10.1016/j.porgcoat.2003.06.001

Ytreberg E, Karlsson J, Eklund B (2010) Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Sci. Total Environ.* 408, 2459–2466. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.02.036

Zagato PA (2008) *Ecotoxicologia*, In: Zagato PA, Bertolotti E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios E Aplicações.* São carlos – SP, pp. 1-13

Zamboni AJ (2000) Caracterização ecotoxicológica do estuário da Lagoa dos Patos no entorno de Rio Grande – RS: Fundamentos e Técnicas. Universidade de São Paulo (USP), São Carlos – SP

Zamboni AJ, Costa JB (2002) Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando tanaidáceos. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. (eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. Salvador - BA. pp. 179-188