



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

CAMILA ALEXANDRE DE LUNA

EFEITO DO DIBUTIL FTALATO EM POPULAÇÕES DE DOIS NEMATOIDES DE VIDA-LIVRE (*DIPLOLAIMELLOIDES OSCHEI* E *LITODITIS MARINA*) SOBRE DIFERENTES REGIMES TÉRMICOS

Recife

2019

CAMILA ALEXANDRE DE LUNA

EFEITO DO DIBUTIL FTALATO EM POPULAÇÕES DE DOIS NEMATOIDES DE VIDA-LIVRE (*DIPLOLAIMELLOIDES OSCHEI* E *LITODITIS MARINA*) SOBRE DIFERENTES REGIMES TÉRMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof^o Dr. Giovanni Amadeu Paiva dos Santos

Coorientador: Prof^o Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Luna, Camila Alexandre de

Efeito do dibutil ftalato em populações de dois nematoides de vida-livre (Diplolaimelloides oschei e Litodis marina) sobre diferentes regimes térmicos/ Camila Alexandre de Luna – 2019.

92 f.: il., fig., tab.

Orientador: Giovani Amadeu Paiva dos Santos
Coorientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2019. Inclui referências.

1. Nematoda 2. Ecotoxicologia 3. Temperatura I. Santos, Giovani Amadeu Paiva dos (orient.) II. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (coorient.) III. Título

592.57

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019-202

CAMILA ALEXANDRE DE LUNA

**Efeito do Dibutil ftalato em populações de dois nematoides de vida-livre
(*Diplolaimelloides oschei* e *Litoditis marina*) sobre diferentes regimes térmicos**

Dissertação apresentada ao departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Eliete Zanardi Lamardo (1º Titular)

Departamento de oceanografia - UFPE

Prof(a). Dr(a). Fabiane Gallucci (2º Titular)

Departamento de Ciências do Mar - Unifesp

Prof(a). Dr(a). José Roberto Botelho de Souza (3º Titular)

Departamento de Zoologia - UFPE

Prof(a). Dr(a). João Pedro Souza Alves (Suplente interno)

Departamento de Zoologia - UFPE

Prof(a). Dr(a). Gustavo Fernandes Camargo Fonseca (Suplente externo)

Departamento de Ciências do Mar - Unifesp

“À minha mãe, que com todo seu amor e dedicação tornou-me o que sou agora. ”

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a quem tornou possível a minha existência, Deus.

Segundo aos meus pais que nunca mediram esforços para me darem o melhor, além de sempre apoiarem minhas decisões.

Em terceiro lugar agradeço a mim mesmo porque na maior vontade de desistência, na menor vontade de estudar, no pior pensamento em relação ao meu futuro, eu fui forte, lutei contra tudo isso, superei e hoje posso dizer que consegui (Espero conseguir o emprego que almejo também, “risos”).

Á minha filha adotiva Ana Beatriz, que me faz querer ser alguém melhor todos os dias para que ela tenha bons exemplos a seguir.

Um agradecimento em especial também para meu amigo e ex-estagiário Bruno, que com todo seu carinho me fez superar muitos obstáculos encontrados no período de mestrado.

Á empresa Coremal, Sara e Nirhvana que me concederam amostras de ftalatos e solventes muito importantes para a realização da pesquisa.

Ao professor Arthur Maia por ter me concedido seu tempo para me ajudar na aquisição dos compostos químicos.

Aos colegas de laboratório, por todos os momentos compartilhados durante meu período do laboratório, por toda ajuda e força. Em especial Flávia, que me ajudou em muitas etapas nos experimentos, além de me tornar alguém cientificamente melhor.

Ao meu namorado Dênis, pela motivação que me deu/dá em todas as horas que eu pensei em desistir e por sempre me lembrar de dizer que “Eu consigo”.

As minhas Louva-deus de estimação Georgina (In memorian), Ariana (In memorian) e Luninha (In memorian) que fizeram meus dias no laboratório muito mais felizes do que eu poderia imaginar.

Ao meu co-orientador Paulo Carvalho e seu doutorando Rômulo por todas as dúvidas esclarecidas.

Ao grupo “Luluzinhas” que fizeram meus anos de mestrado se tornarem mais fáceis. Por sempre estarem comigo, me motivando e me emprestando um ombro amigo. Amo tanto vocês <3.

Ás minhas amigas Évelyn, Rayane, Maiely, Lícia, Daniela, Isabela e Rayanny que estão comigo há anos e espero manter para o resto da vida.

Ao Ygor e sua família que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Á todos que contribuíram para que esse mestrado pudesse ser realizado.

Á todos que me deram força nesse último momento de mestrado, além da motivação que eu ganhei para realizar um dos meus sonhos nesta etapa final: A de poder ter aula em uma universidade do exterior.

Á todas as fontes financeiras (Facepe e Capes).

E por último e não menos importante, ao meu orientador Giovanni Santos, que por anos vem me tornando alguém cientificamente melhor. Tenho que agradecer de coração por todas as oportunidades e sermões durante todos esses anos. Foi uma honra ser sua aluna. Muita gratidão.

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente
somos”.

(DUMBLEDORE, 2002)

RESUMO

O Dibutil ftalato (DBP) é um importante aditivo na indústria cosmética que se torna disponível no ambiente marinho/estuarino quando materiais que o contém são descartados de forma inadequada podendo comprometer a funcionalidade de organismos marinhos. Além do mais, o aumento da temperatura é um fator que pode potencializar o efeito desse aditivo. Já é considerado um contaminante onipresente e que tem uma alta adsorção no sedimento, no qual abriga nematoides em abundância. Logo, o presente estudo investiga exposições letais e sub-letais do DBP, verificando a capacidade do mesmo de modificar parâmetros populacionais e embrionários dos nematoides estuarinos *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei* individualmente e quando estão em competição e também analisar se o aumento da temperatura potencializa o efeito do DBP na interação desses nematoides. Seis experimentos foram realizados em microcosmo. Dois experimentos verificaram a letalidade do DBP em *L. marina* e *D. oschei* individualmente. 100 nematoides de cada espécie eram adicionados em placas de Petri contaminadas com 16; 32; 64; 128; 256 e 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DBP, onde foram incubados a 18° C durante cinco dias. A cada 24 h nesse período os nematoides vivos e mortos eram contabilizados. Outros dois experimentos verificaram os efeitos sub-letais do DBP (0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em *L. marina* e *D. oschei* individualmente, analisando parâmetros de crescimento populacional total (jovens e adultos), jovens e adultos individualmente, além de tempos de desenvolvimento (Total, pré e pós- embrionário) e proporções sexuais. Onde eram colocados 6 machos e 6 fêmeas por placa e contabilizados número de ovos, jovens, machos e fêmeas no período de 24h durante 15 dias para *L. marina* e 48h durante 28 dias para *D. oschei*. Por último, dois experimentos de interação onde eram adicionados 6 machos e 6 fêmeas de *L. marina* e *D. oschei* na mesma placa, onde um experimento verificava o efeito isolado do DBP na interação desses nematoides, com diferentes concentrações do DBP (0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o segundo experimento com 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DBP em diferentes temperaturas (18° C, 22°C, 26°C e 30°C). Para Letalidade ambos os nematoides apresentaram alta tolerância ao DBP não sendo observada mortalidade de 100% em nenhuma das concentrações testadas. Em relação à sub-letalidade, o DBP foi altamente tóxico para ambas as espécies já que até a menor concentração testada (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) modificou parâmetros populacionais e embrionários. Nos experimentos de interação, não foi observado crescimento populacional de *D. oschei*, porém a poluição

diminuiu o efeito competitivo, diminuindo drasticamente populações de *L. marina* e corroborando com a hipótese de que o efeito do DBP é potencializado pelo aumento da temperatura. Os nematoides aqui investigados foram altamente tolerantes a exposição de curto prazo, porém afetados com exposições em longo prazo. Ambas as espécies apresentaram diferentes sensibilidades ao DBP e estratégias de vida.

Palavras-Chave: Ecotoxicologia. Nematoda. Plastificantes. Temperatura.

ABSTRACT

Dibutyl phthalate (DBP) is an important additive in the cosmetic industry that becomes available in the marine/estuarine environment when materials containing it are improperly disposed of and may compromise the functionality of marine organisms. Moreover, the increase in temperature is a factor that may potentiate the effect of this additive. It is already considered a ubiquitous contaminant and has a high absorption in the sediment, in which it houses nematodes in abundance. Therefore, the present study investigates lethal and sub-lethal exposures of DBP, verifying its capacity to modify population and embryonic parameters of the estuarine nematodes *Litoditis marina* and *Diplolaimelloides oschei* individually and when they are in competition and also to analyze if the increase of temperature potentiates the effect of DBP on the interaction of these nematodes. Six experiments were performed in microcosm. Two experiments verified the lethality of DBP in *L. marina* and *D. oschei* individually. 100 nematodes of each species were added to Petri dishes contaminated with 16; 32; 64; 128; 256 and 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DBP, where they were incubated at 18°C for five days. Every 24 hours in this period, the living and dead nematodes were counted. Two other experiments verified the sublethal effects of DBP (0.5; 1; 2; 4, 8 and 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in *L. marina* and *D. oschei* individually, analyzing parameters of total population growth (youth and adults), youth and adults individually, as well as developmental time (Total, pre and post-embryonic) and sexual proportions. Where 6 males and 6 females were placed per plate and counted the number of eggs, young, males and females in the period of 24 hours for 15 days for *L. marina* and 48 hours for 28 days for *D. oschei*. Finally, two interaction experiments where 6 males and 6 females of *L. marina* and *D. oschei* were added on the same plate, where an experiment verified the isolated effect of DBP on the interaction of these nematodes, with different concentrations of DBP (0.5; 1; 2; 4; 8; 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) And the second experiment with 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DBP at different temperatures (18°C, 22°C, 26°C and 30°C). For lethality, both nematodes presented a high tolerance to DBP, with no mortality of 100% observed in any of the concentrations tested. In relation to sub-lethality, DBP was highly toxic for both species since even the lowest concentration tested (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) modified population and embryonic parameters. In the interaction experiments, it was not observed a population growth of *D. oschei*, but the pollution decreased the competitive effect, drastically reducing populations of *L. marina* and corroborating with the hypothesis that the effect of DBP is potentialized by the increase in temperature. Compared with other

invertebrates, the nematodes investigated here were highly tolerant of short-term exposure, but affected with long-term exposures. Both species presented different sensitivities to DBP and life strategies.

Keywords: Ecotoxicology. Nematoda. Plasticizers. Temperature

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Produção de materiais plásticos por região do mundo.....	24
Figura 2 –	Classificação dos oceanos por plástico superficial.....	26
Figura 3 –	Imagens sobre os variados efeitos da poluição por plásticos na vida marinha...27	
Figura 4 –	Estrutura básica dos ftalatos.....	30
Figura 5 –	Estrutura molecular simples (A) e em 3D (B) do Dibutil ftalato.	34
Figura 6 –	Taxa de Mortalidade de <i>Litoditis marina</i>	46
Figura 7 –	Crescimento populacional de A- Nematoides jovens, B- Adultos e C- População total de <i>Litoditis marina</i> , ao longo do tempo	47
Figura 8 –	MDS do Tempo de desenvolvimento Total de <i>L. marina</i>	49
Figura 9 –	Taxa de Mortalidade (Valor bruto) de <i>Diplolaimelloides oschei</i>	50
Figura 10 –	MDS da População total de <i>D. oschei</i>	51
Figura 11 –	Crescimento populacional de A- Nematoides jovens, B- Adultos e C- População total de <i>Diplolaimelloides oschei</i> , ao longo do tempo	51
Figura 12 –	MDS da População de jovens de <i>D. oschei</i>	52
Figura 13 –	MDS do Tempo de desenvolvimento total de <i>D. oschei</i>	53
Figura 14 –	Média das réplicas da População de jovens (A), de adultos (B) e População total (C) de <i>Litoditis marina</i> em cada tratamento (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) ao longo do tempo.....	70
Figura 15 –	População total de <i>D. oschei</i> ao longo do tempo em diferentes concentrações de DBP (em $\mu\text{g mL}^{-1}$)	72

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1- Cálculo e forma de análise de todos os parâmetros analisados no presente estudo, para as espécies *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei*. (ASC) = Área abaixo da curva.....45
- Quadro 2 - Cálculo e forma de análise de todos os parâmetros analisados no presente estudo para as espécies *Litoditis marina* (ASC) = Área abaixo da curva. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de desenvolvimento total (TDT), Tempo de maturação (TDM), em dias, e Oviposição diária de <i>Litoditis marina</i> em diferentes tratamentos do DBP.	48
Tabela 2 – Média e Erro Padrão do Tempo de desenvolvimento total (TDT), Tempo de maturação (TDM), Tempo de eclosão de ovos (TDE) e Oviposição diária de <i>Diplolaimelloides oschei</i> em diferentes tratamentos do DBP.	53
Tabela 3 – Resumo dos resultados dos parâmetros populacionais e embrionários de ambas as espécies modificados após 14 e 28 dias de exposição ao Dibutil ftalato em <i>Litoditis marina</i> e <i>Diplolaimelloides oschei</i> , respectivamente.	54
Tabela 4 – Média e Erro Padrão da Oviposição diária de <i>Litoditis marina</i> em diferentes tratamentos do DBP.	71
Tabela 5 – Média das réplicas do número de indivíduos de <i>L. marina</i> calculada pela Área sob a curva (ASC) dos Parâmetros populacionais nos diferentes tratamentos de temperatura dos controles.	73
Tabela 6 – Média e Erro Padrão da Oviposição diária de <i>Litoditis marina</i> em diferentes tratamentos de temperatura.....	75
Tabela 7 – Parâmetros populacionais de <i>Litoditis marina</i> em 2µg mL ⁻¹ de DBP para diferentes tratamentos de temperatura.....	76
Tabela 8 – Média das réplicas de todos os parâmetros populacionais e embrionários de <i>L. marina</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
CENO	Concentração de efeito não observado
CL50	Concentração letal que mata 50% da população
<i>D. oshei</i>	<i>Diplolaimelloides oschei</i>
DBP	Dibutil ftalato
Tm	Toneladas métricas
DEP	Dietil ftalato
DMP	Dimetil ftalato
Edf	Ésteres de ftalato
Edf	Ésteres de ftalatos
KOW	Coeficiente de partição octanol-água
<i>L. marina</i>	<i>Litoditis marina</i>
PVC	Policloreto de vinila
TDE	Tempo de eclosão dos ovos
TDM	Tempo de maturação
TDT	Tempo de desenvolvimento total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.1.1	OBJETIVO GERAL	22
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	PRODUÇÃO DE MATERIAIS PLÁSTICOS	23
2.2	POLUIÇÃO OCEÂNICA POR PLÁSTICOS	25
2.2.1	Efeitos da poluição por plásticos	26
2.2.2	Temperatura potencializando efeitos da contaminação por aditivos plásticos. ..	28
2.3	ÉSTERES DE FTALATOS	29
2.3.1	Dibutil ftalato e seus efeitos em organismos aquáticos.....	33
2.4	NEMATOIDES COMO BIOMODELOS PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS ..	34
2.4.1	Litoditis marina como modelo biológico	35
2.4.2	Diplolaimelloides oschei como modelo biológico	36
3	MANUSCRITO I	37
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MÉTODOS.....	40
3.2.1	Escolha e cultivo dos biomodelos	40
3.2.2	Ftalato e solventes	41
3.2.3	Preparação das concentrações do Dibutil ftalato.....	42
3.2.4	Preparação dos bioensaios.....	42
3.2.5	Cálculo dos parâmetros	43
3.2.6	Análise de dados.....	43
3.3	RESULTADOS	46
3.3.1	<i>Litoditis marina</i>	46

3.3.2	<i>Diplolaimelloides oschei</i>	49
3.4	DISCUSSÃO.....	55
3.4.1	Efeito letal do Dibutil ftalato.....	55
3.4.2	Efeitos sub-letais do Dibutil ftalato.....	56
3.5	CONCLUSÃO.....	61
	AGRADECIMENTOS	61
4	MANUSCRITO II	62
4.1	INTRODUÇÃO.....	63
4.2	MÉTODOS.....	65
4.2.1	Escolha e cultivo dos biomodelos	65
4.2.2	Ftalato e solventes	66
4.2.3	Preparação das concentrações do Dibutil ftalato.....	66
4.2.4	Preparação dos bioensaios.....	67
4.2.5	Cálculo dos parâmetros	68
4.2.6	Análise de dados.....	68
4.3	RESULTADOS	69
4.3.1	População de <i>Litoditis marina</i> na presença de <i>Diplolaimelloides oschei</i> (Teste 1)...	69
4.3.2	População de <i>Litoditis marina</i> na presença de <i>Diplolaimelloides oschei</i> + estressor de temperatura (Teste 2).....	72
4.4	DISCUSSÃO.....	77
4.5	CONCLUSÃO.....	81
5	REFERÊNCIAS	83
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

1 INTRODUÇÃO

Quando o material plástico é descartado de forma inadequada no meio ambiente, seu tempo de vida, que depende do tipo de material plástico, pode ultrapassar mais de 450 anos. Isto faz com que esse material seja cada vez mais acumulado no meio ambiente ao longo do tempo. O plástico é resistente aos mais diversos tipos de intempéries, sendo assim, é considerado um poluente em potencial (ALVARENGA *et al.*, 2017). A única forma de retirá-lo completamente do meio ambiente, é através de processos de combustão ou pirólise, porém esses processos exigem uma grande atenção devido às emissões de gás carbônico (CO₂) liberadas na atmosfera. Além disso, esses processos exigem pré-requisitos, como por exemplo, o tipo de plástico, que por muitas vezes tornam esses processos inviabilizados, além do alto custo de manutenção tanto da operação, quanto no tratamento de resíduos que podem ser liberados no processo (DA SILVA SPINACÉ & DE PAOLI, 2005). Logo, grande parte desses materiais vai parar em aterros sanitários, ou no ambiente marinho, este último tendo maior atenção, devido aos grandes danos causados em animais que vivem nesse meio (HAMMER & VANBROCKLIN, 2016).

A contaminação por materiais plásticos pode ocorrer tanto quando o animal ingere o material plástico (KOELMANS *et al.*, 2014), ou por sua disponibilidade no ambiente marinho. O material plástico tem, em sua composição, aditivos que podem ser extremamente danosos para animais que são expostos a eles. Os principais aditivos são Bisfenol A, Nonilfenol e Ésteres de ftalato (HERMABESSIERE *et al.*, 2017). Muitos estudos relatam que esses aditivos são frequentemente encontrados em amostras de água e sedimento (FROMME *et al.*, 2002), concentrados em organismos marinhos (WEI *et al.*, 2011) e bioacumulados pela cadeia trófica (MACKINTOSH *et al.*, 2004). Além do mais, a toxicidade desses aditivos pode ser dependente de fatores abióticos como salinidade e temperatura (XU & LI, 2008; ROSE *et al.*, 2012), esta última recebendo mais atenção devido à aceleração do efeito estufa (Aquecimento global) que está ocorrendo no planeta (EVANS, 2019).

Além do potencial efeito do aumento da temperatura favorecer a toxicidade de aditivos plásticos, por muitas vezes, a temperatura é um fator responsável por liberar essas substâncias com mais facilidade no ambiente e torna-las biodisponíveis. Particularmente existe um grupo importante de aditivos plásticos que depende da temperatura para se tornar disponível no ambiente marinho e é o grupo dos Ésteres de ftalato (Edf). Este grupo é muito

utilizado na indústria de plástico e começou a chamar a atenção pelo seu potencial risco à vida marinha (ZHANG *et al.*, 2018a).

Os nematoides são animais adequados para serem usados em testes de toxicidade laboratorial (HÄGERBÄUMER *et al.*, 2015), também são excelentes bioindicadores (WILSON & KHAKOULI-DUARTE, 2009) de qualidade ecológica, como foi mostrado no estudo feito em ecossistemas costeiros do Mar Mediterrâneo, onde os resultados dessa pesquisa revelaram que os nematoides representam uma assembleia altamente informativa (MORENO *et al.*, 2011). Contudo, nematoides são organismos chave para o entendimento de questões ecológicas e algumas espécies em particular dão suporte para estudos experimentais de curta duração e baixo custo.

Por este motivo este trabalho objetiva analisar os efeitos agudos e crônicos do Dibutil Ftalato, através de duas espécies de nematoides marinhos *Diplolaimelloides oschei* e *Litoditis marina* observando mudanças nos ciclos de vida desses animais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar ex situ os possíveis impactos causados pela poluição antrópica em populações dos nematóides de vida-livre *Diplolaimelloides oschei* e *Litoditis marina* e analisar possível efeito do aumento da temperatura, nas respostas funcionais destas espécies.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1.1 Capítulo I

- Definir concentrações letais e sub-letais do Dibutil ftalato para as populações dos nematoides *Diplolaimelloides oschei* e *Litoditis marina* individualmente.
- Analisar o tamanho populacional de adultos e jovens de ambas as espécies individualmente expostas a concentrações sub-letais do Dibutil ftalato.
- Avaliar os tempos de desenvolvimento (Ecloração de ovos, crescimento de larvas e maturação) e taxa de oviposição diária de ambas as espécies individualmente expostas a concentrações sub-letais do Dibutil ftalato.

2.1.1.2 Capítulo II

- Definir concentrações sub-letais do Dibutil ftalato para as populações dos nematoides *Diplolaimelloides oschei* e *Litoditis marina* quando postos em interação.
- Analisar o tamanho populacional de adultos e jovens de ambas as espécies expostas a concentrações sub-letais do Dibutil ftalato quando estão em interação.

Testar os efeitos sub-letais do Dibutil ftalato associado ao estresse térmico para as espécies *Diplolaimelloides oschei* e *Litoditis marina* quando postas em interação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PRODUÇÃO DE MATERIAIS PLÁSTICOS

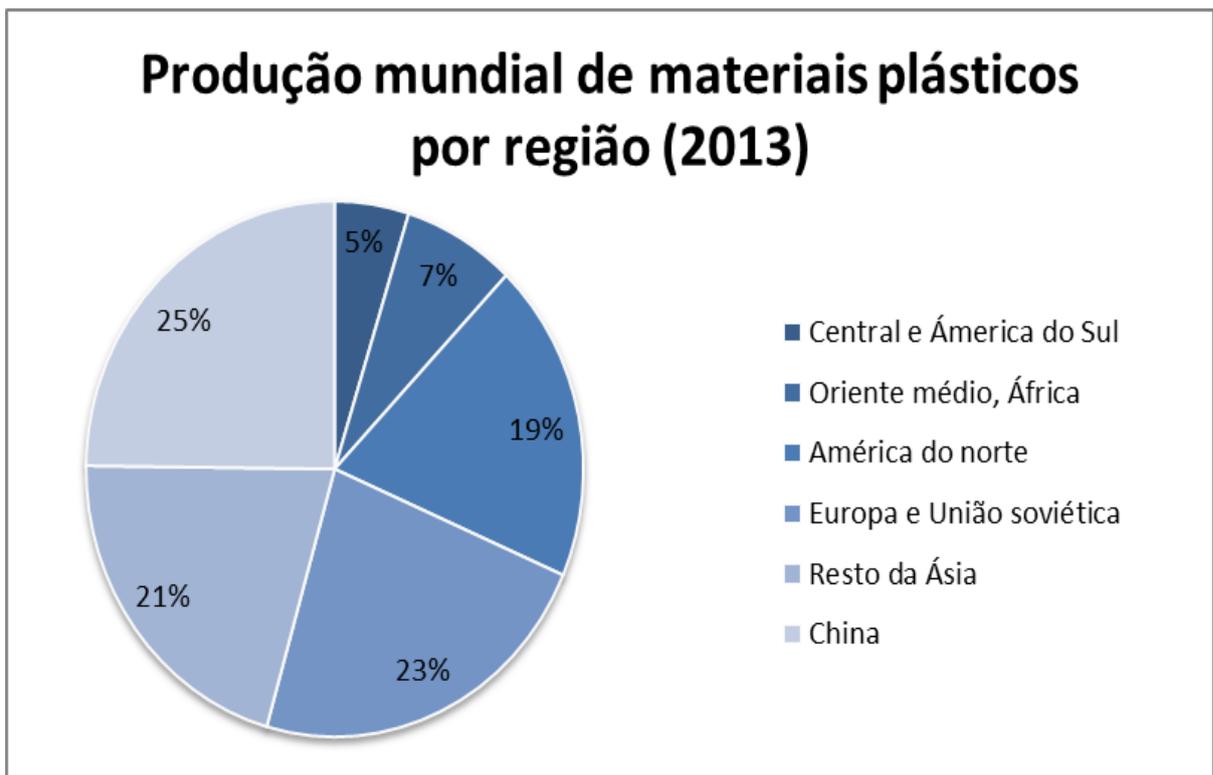
O século XXI está sendo marcado por grandes impactos ambientais e parte desses impactos é causada por materiais plásticos. O início de sua produção se deu na década de 1860, porém tomou força em 1920 (GOURMELON, 2015), justamente no período de revolução industrial. Hoje em dia, materiais como metal e vidro são substituídos por plásticos, devido ao baixo custo de produção e aquisição. A produção de materiais plásticos estimada no mundo chegou a 8,3 bilhões de toneladas métricas (Tm) em 2015, e a partir desses foram gerados 6,3 bilhões de Tm de resíduos plásticos, onde apenas 30% estão, de fato, em uso e 60% estão descartados em aterros sanitários e no meio ambiente (GEYER *et al.*, 2017). No Brasil, a revolução industrial começou no fim do século XIX, onde grandes cafeicultores investiram em processos industriais. Porém nessa época ainda não se tinha conhecimento suficiente sobre os malefícios que essas atividades poderiam causar ao meio ambiente. Apenas no século XX é que se começou a falar sobre meios de conservação e preservação do meio ambiente (KOTLER *et al.*, 2012), pois foi justamente nessa época que a revolução industrial intensificou e com isso a produção de materiais plásticos ganhou força.

No começo do século XX a produção de materiais plásticos ficou ainda mais forte, pois foram cada vez mais utilizados na fabricação dos mais variados objetos. Sua versatilidade é tamanha que, desde então, eles têm provocado mudanças no consumo e no estilo de vida das pessoas. Um dos aspectos decisivos, responsáveis pela grande disseminação na utilização do plástico, é o aspecto econômico, pois é possível confeccionar os mais diferentes utensílios de plástico com custo reduzido, sendo mais acessíveis à população (GOURMELON, 2015). A partir de moléculas de monômeros (Derivados do petróleo) é possível a fabricação de vários tipos de plásticos, que podem ser processados em temperaturas baixas, quando comparados a outros materiais, tais como alumínio e aço, o que reflete no baixo custo de fabricação.

Muitas outras propriedades tornam o plástico um material versátil e duradouro: baixa condutibilidade elétrica e térmica, alta resistência ao ataque químico de substâncias, tais como o oxigênio, ácidos e bases. As resinas plásticas podem ser facilmente misturadas com outras substâncias que podem lhes conferir novas propriedades, sendo possível alterar o cheiro, a cor, a elasticidade, resistência a impactos, resistência ao calor e à

luz, ampliando as possibilidades de aplicações (GORNI, 2003). Devido a essas propriedades, o plástico tornou-se o material mais produzido no mundo todo, tendo sua maior produção, principalmente, em países de primeiro mundo (Figura 1). Contudo sua grande produção representa um sério problema ecológico devido à grande produção e substâncias que são adicionadas em sua fabricação.

Figura 1 - Produção de materiais plásticos por região do mundo. Os dados são baseados em estimativas de produção de materiais plásticos no ano de 2013. Nesse ano, foram produzidos mundialmente cerca de 299 milhões de toneladas métricas.



Fonte: (GOURMELON, 2015).

Quando o material plástico é descartado de forma inadequada no meio ambiente, seu tempo de vida, que depende do tipo de material plástico, pode ultrapassar mais de 450 anos. Isto faz com que esse material seja cada vez mais acumulado no meio ambiente ao longo do tempo. O plástico é resistente aos mais diversos tipos de intempéries, sendo assim, é considerado um poluente em potencial (ALVARENGA *et al.*, 2017). A única forma de retirá-lo completamente do meio ambiente, é através de processos de combustão ou pirólise, porém esses processos exigem uma grande atenção devido às emissões de gás

carbônico (CO₂) liberadas na atmosfera. Além disso, esses processos exigem pré-requisitos, como por exemplo, o tipo de plástico, que por muitas vezes tornam esses processos inviabilizados, além do alto custo de manutenção tanto da operação, quanto no tratamento de resíduos que podem ser liberados no processo (DA SILVA SPINACÉ & DE PAOLI, 2005). Logo, grande parte desses materiais vai parar em aterros sanitários, ou no ambiente marinho, este último tendo maior atenção, devido aos grandes danos causados em animais que vivem nesse meio (HAMMER & VANBROCKLIN, 2016)

2.2 POLUIÇÃO OCEÂNICA POR PLÁSTICOS

Os oceanos cobrem dois terços da superfície terrestre e há muito tempo são usados como depósito de diferentes tipos de resíduos produzidos pelo homem, incluindo materiais plásticos. O depósito desses materiais é proveniente do lançamento proposital, manipulação ou eliminação descuidada, e muitas vezes, tem origem em locais longínquos da costa. Entre os fatores que influenciam a ampla produção desses materiais estão o número de habitantes no território, nível educacional e poder aquisitivo desses habitantes, além da frequência e eficiência do sistema de coleta (ARAÚJO & SILVA-CAVALCANTI, 2016). Essa influência aumenta ainda mais o número de materiais descartados nos oceanos e é atualmente, sem dúvida, um dos grandes fatores que ameaçam a vida marinha.

Em 2010 estimou-se que cerca de 4 a 12 milhões de Tm de materiais plásticos gerados na terra, adentraram no ambiente marinho (JAMBECK *et al.*, 2015). Um estudo estimou quantas peças de materiais plásticos estavam espalhadas nas principais bacias oceânicas, além de seu peso (Figura 2). Esses dados revelaram que o hemisfério norte é mais afetado pela poluição plástica do que o hemisfério sul, representando 56% do total de resíduos plásticos encontrados (ERIKSEN *et al.*, 2014).

Figura 2 – Classificação dos oceanos por plástico superficial (Peças e peso em toneladas).

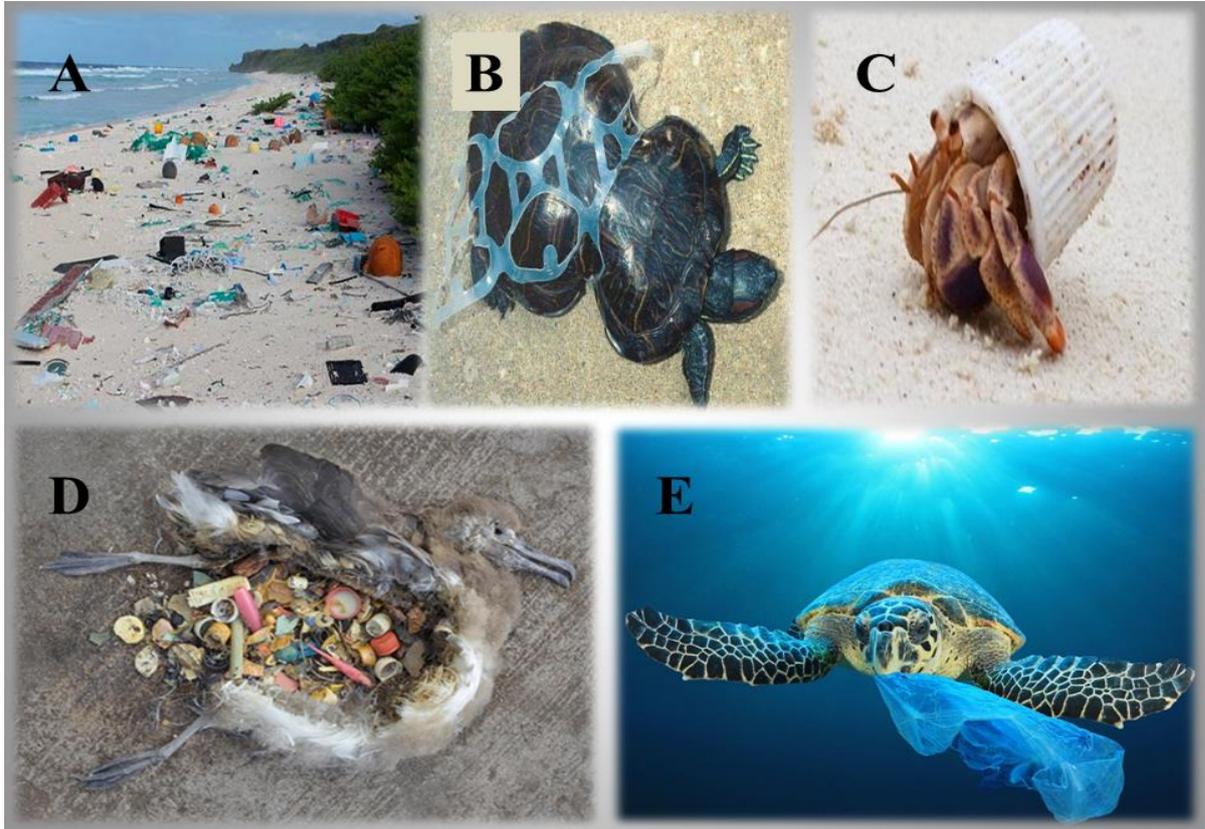


Fonte: (ERIKSEN *et al.*, 2014); Disponível em <https://www.weforum.org/agenda/2016/08/plastic-pollution-which-oceans-contain-most/>.

2.2.1 Efeitos da poluição por plásticos

A poluição por plástico é, de fato, onipresente no ambiente marinho e sua gravidade só foi reconhecida no final do século XIX (STEFATOS *et al.*, 1999), entretanto hoje é o assunto que mais causa preocupação dentre pesquisadores ambientais por suas variadas consequências no ambiente marinho. Além de esteticamente tornarem mares e oceanos desagradáveis, os plásticos podem atingir toda a fauna marinha e animais terrestres que dela dependem de variadas formas (Figura 3). As consequências da poluição por plástico já é bem relatada, e podem ser divididas em consequências diretas e indiretas (DERRAIK, 2002; COLE *et al.*, 2011; WRIGHT *et al.*, 2013; SETÄLÄ *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2018; MACHOVSKY-CAPUSKA *et al.*, 2019).

Figura 3 – Imagens sobre os variados efeitos da poluição por plásticos na vida marinha. A) Henderson Island (Ilha do Pacífico sul), repleta de lixo plástico, tornando-a visivelmente desagradável. B) Tartaruga marinha deformada por material plástico. C) Um pequeno crustáceo fazendo um copo de plástico de moradia. D) Ave marinha morta pela ingestão de pequenos materiais plásticos. E) Tartaruga marinha alimentando-se de sacola plástica.



Fonte: Autores desconhecidos, imagens retiradas do Google imagens.

Muitos efeitos diretos podem ser relatados sobre como a poluição por plásticos afeta a vida marinha. Entre eles são, a habitação, a lesão corporal por plásticos e a ingestão desses materiais. A habitação ocorre quando pequenas peças de materiais plásticos, como garrafas e copos, servem de moradia para o animal. Um exemplo bem prático são pequenos crustáceos, popularmente conhecidos como paguros, que se adaptaram à ocupação de conchas de certos moluscos. Uma das funções dessas conchas é proteger o animal de predadores (BATISTA-LEITE *et al.*, 2005). Quando o animal troca essa concha por material plástico, por exemplo, ele se torna mais suscetível ao ataque de predadores, devido ao fácil desprendimento do material plástico do corpo do animal, além de sua fragilidade. Outro efeito direto que pode ocorrer é a lesão corporal que os materiais plásticos causam em diversos organismos marinhos. Muitos animais ficam emaranhados em peças plásticas, devido a isso, muitos animais como, aves marinhas, tartarugas marinhas, peixes e invertebrados podem

sofrer com má-formação corporal (Figura 3B) ou podem ser impedidos de respirar ou se alimentar (LAIST, 1987; GALL & THOMPSON, 2015).

Outro efeito direto, que vem recebendo maior atenção, é a ingestão de materiais plásticos (MACHOVSKY-CAPUSKA *et al.*, 2019). Muitos animais acabam morrendo pela ingestão do plástico que não serve como nutriente para os organismos e também entopem vias respiratórias e digestórias. Já é muito bem relatada a ingestão de plásticos por organismos marinhos em diferentes níveis tróficos, bem como aves (FRY *et al.*, 1987; MOSER & LEE, 1992; DREVER *et al.*, 2018), mamíferos (BAIRD & HOOKER, 2000; JACOBSEN *et al.*, 2010), tartarugas (CAMPANI *et al.*, 2013), peixes (CARPENTER *et al.*, 1972; BOERGER *et al.*, 2010) e invertebrados (GOLDSTEIN *et al.*, 2012; KAPOSI *et al.*, 2014; SETÄLÄ *et al.*, 2016). Porém, além da ingestão, pode ocorrer também à contaminação por aditivos presentes em muitos materiais plásticos, assim como de outros contaminantes e isso pode ser caracterizado como um efeito indireto da poluição por plástico, devido ao tempo e acúmulo desse material.

A contaminação por materiais plásticos pode ocorrer tanto quando o animal ingere o material plástico (KOELMANS *et al.*, 2014), ou por sua disponibilidade no ambiente marinho. O material plástico tem, em sua composição, aditivos que podem ser extremamente danosos para animais que são expostos a eles. Os principais aditivos são Bisfenol A, Nonilfenol e Ésteres de ftalato (HERMABESSIERE *et al.*, 2017). Muitos estudos relatam que esses aditivos são frequentemente encontrados em amostras de água e sedimento (FROMME *et al.*, 2002), concentrados em organismos marinhos (WEI *et al.*, 2011) e bioacumulados pela cadeia trófica (MACKINTOSH *et al.*, 2004). Além do mais, a toxicidade desses aditivos pode ser dependente de fatores abióticos como salinidade e temperatura (XU & LI, 2008; ROSE *et al.*, 2012), esta última recebendo mais atenção devido à aceleração do efeito estufa (Aquecimento global) que está ocorrendo no planeta (EVANS, 2019).

2.2.2 *Temperatura potencializando efeitos da contaminação por aditivos plásticos.*

A temperatura é um fator abiótico que pode determinar a toxidade de muitos aditivos plásticos (CAIRNS JR *et al.*, 1975). Apesar de esse assunto ainda ser muito limitado, particularmente, vem recebendo maior atenção nos últimos anos, pois o planeta terra está aquecendo devido às grandes emissões de CO₂ causadas, em sua maior parte, pela ação

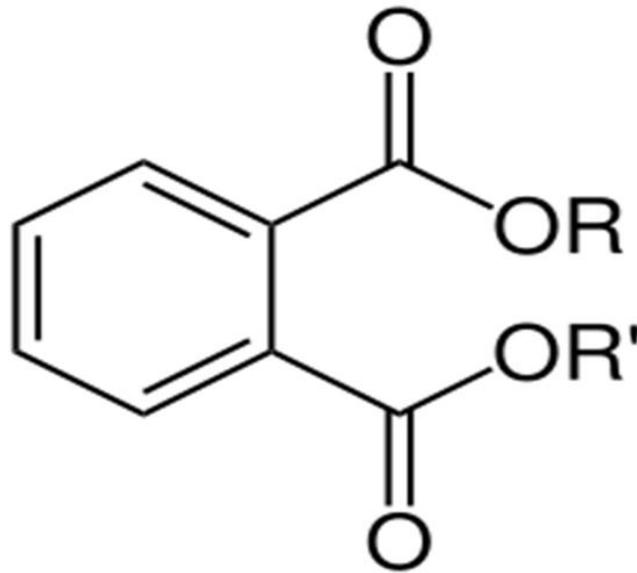
antrópica e de fato vem afetando a vida marinha (VAQUER-SUNYER & DUARTE, 2011; KROEKER *et al.*, 2013). Por si só, a temperatura sensibiliza diversos organismos marinhos e modifica parâmetros de sobrevivência (NEWELL & BRANCH, 1980; MOENS & VINCX, 2000; O'CONNOR *et al.*, 2007; DE MEESTER *et al.*, 2015a; INGELS *et al.*, 2018). Em algumas espécies crípticas de nematoides de vida-livre, por exemplo, o aumento da temperatura, que às vezes deve-se ao aquecimento global, pode beneficiar o crescimento populacional de umas espécies e prejudicar o crescimento populacional de outras (DE MEESTER *et al.*, 2015a), pode comprometer o desenvolvimento de decápodes da família Lithodidae (THATJE & HALL, 2016) e pode favorecer os efeitos da contaminação por metais pesados (BAT *et al.*, 2000; SOKOLOVA & LANNIG, 2008; MEVENKAMP *et al.*, 2017) e aditivos plásticos.

Além do potencial efeito do aumento da temperatura favorecer a toxicidade de aditivos plásticos, por muitas vezes, a temperatura é um fator responsável por liberar essas substâncias com mais facilidade no ambiente e torna-las biodisponíveis. Particularmente existe um grupo importante de aditivos plásticos que depende da temperatura para se tornar disponível no ambiente marinho e é o grupo dos Ésteres de ftalato (Edf). Este grupo é muito utilizado na indústria de plástico e começou a chamar a atenção pelo seu potencial risco à vida marinha (ZHANG *et al.*, 2018a).

2.3 ÉSTERES DE FTALATOS

Ftalatos (no inglês Phthalates) são compostos orgânicos, do grupo “Éster”, derivados do ácido 1,2-benzeno dicarboxílico quando os grupos éster estão na posição Orto (Figura 4). São comumente chamados de plastificantes, pois são adicionados em materiais plásticos para modificar suas características físicas, como por exemplo, torna-los mais maleáveis. Existem mais de 30 tipos de ftalatos e a maioria é utilizada em indústrias de embalagens, cosméticos e até medicinais. Ainda há grande controvérsia sobre os efeitos de ftalatos no meio ambiente, em animais não humanos e humanos, no entanto sabe-se que eles estão presentes, em concentrações relevantes em amostras coletadas pelo mundo (GIAM *et al.*, 1978). Além do mais, estudos com invertebrados reforçam a hipótese de que concentrações de ftalatos, mesmo sendo eliminados rapidamente pelo corpo, ainda podem trazer grandes transtornos a esse grupo (GAO & WEN, 2016).

Figura 4 – Estrutura básica dos ftalatos.



Fonte: Google imagens.

Em 1925, o uso de ésteres de ácido ftálico foi bem reportado quanto ao seu uso como plastificantes (BROWN, 1925), embora naquele ano ainda não houvessem pesquisas relacionadas aos seus efeitos tóxicos em animais e no meio ambiente. Em 1967, um estudo pioneiro demonstrou certa preocupação em relação à toxicidade de compostos de ftalatos. NEMATOLLAHI *et al.* (1967) desenvolveram estudos toxicológicos em células de ratos e alertaram, pela primeira vez, que o uso de ftalatos em aplicações médicas pode ser tóxico à saúde. Já na década de 70, começaram a aparecer ainda mais estudos relacionando os plastificantes com a saúde. Nesse período foram feitos testes, de novos equipamentos, em pacientes que estavam submetidos à hemodiálise. Foram encontradas relações entre os tubos de sangue, fabricados com cloreto de polivinilo (PVC) e a incidência de hepatite (NEERGAARD *et al.*, 1971). No ano seguinte a essa publicação, um estudo relatou a migração de um éster de ftalato para o sangue humano através de bolsas de sangue (JAEGER & RUBIN, 1972). Em 1972, pela primeira vez, os ftalatos foram denominados como contaminantes ambientais através de amostras coletadas em peixes (MAYER *et al.*, 1972). Já em 1973, uma grande quantidade de artigos foi publicada referente à toxicologia dos ftalatos em humanos e ratos (GESLER, 1973; JAEGER & RUBIN, 1973; NIKONOROW *et al.*, 1973;

PETERS & COOK, 1973) e pela primeira vez em invertebrados aquáticos no crustáceo *Daphnia magna* (SANDERS *et al.*, 1973).

Com o aumento crescente de estudos identificando ftalatos em amostras de água e em organismos aquáticos, em 1978 eles foram considerados poluentes marinhos. Um estudo propôs avaliar os impactos ambientais ocasionados pelos ftalatos. Amostras coletadas no golfo do México e em regiões do Atlântico norte continham ftalatos presentes em concentrações consideradas altas (GIAM *et al.*, 1978). Nos anos que sucederam, essas estimativas foram ficando cada vez mais complexas e rigorosas com relação aos impactos em organismos aquáticos. SOLBAKKEN *et al.* (1985) estudou a absorção e eliminação de ésteres de ftalato em mexilhões de recifes de corais e fez uma comparação com outro contaminante, o γ -hexaclorociclohexano (Lindano). O éster de ftalato teve maiores concentrações do que o lindano no hepatopâncreas e no sangue desses animais, porém tiveram menor absorção nos tecidos branquiais e musculares. Ainda não se sabia os fatores responsáveis por essas diferenças, mas deduziram que o conteúdo lipídico do tecido e as características químicas de ligações das toxinas são fatores importantes. Em sua conclusão eles citaram que os efeitos agudos dos ftalatos foram inferiores aos do lindano porque o mesmo contém baixa absorção e baixa toxicidade e isso traria menor acumulação em níveis tróficos elevados. Contudo, esses animais eliminam o lindano e os ftalatos rapidamente de seus organismos e isso contribui com o biomonitoramento, pois encontrar esses poluentes no organismo desses animais significa que o ambiente foi contaminado recentemente.

Passados alguns anos, uma importante revisão foi feita com 8 ésteres de ftalatos (GOBAS *et al.*, 2003) para analisar se esses poluentes são acumulados em diferentes níveis tróficos aquáticos. Esse teste foi realizado com peixes, algas, macrófitas, crustáceos, poliquetas, moluscos, insetos aquáticos e outros organismos. Os autores informam que há uma importante relação entre o coeficiente de partição octanol/água (Log KOW) de uma substância e seu poder bioacumulativo, onde uma substância é considerada bioacumulativa quando seu log KOW é maior que 10^5 . Contudo, os autores concluíram que a bioacumulação dos ésteres de ftalatos em rede alimentar não ocorre, mesmo com seus altos índices de partição octanol-água. Porém, sua disponibilidade no meio ambiente será maior quanto maior for o seu peso molecular.

Em 2007 surge o primeiro estudo de exposição a ftalatos com o nematoide de vida-livre *Caenorhabditis elegans*, que apesar da espécie não ser marinha, é um animal altamente

estudado no mundo e sobre o qual existe um grande conhecimento em genética e neurologia (BRENNER, 1974; FÉLIX & BRAENDLE, 2010). Nesse estudo os autores expuseram diretamente *C. elegans* em contato com o Bis (2-etilhexil) Ftalato (DEHP) durante 24 horas e utilizaram “endpoints” como mortalidade, crescimento, reprodução e expressão gênica. Após 24 horas a concentração letal que mata 50% da população (CI50) foi estimada, através da estimativa probits, em $22,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as concentrações subletais em 0,02; 0,2 e $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os nematoides expostos as concentrações de 0,02 e $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostraram diminuição no comprimento do corpo e também uma diminuição na produção de ovos. Outro estudo também revelou que *C. elegans* apresentou alterações no seu sistema locomotor e neurológico quando expostos a compostos de ftalatos (TSENG *et al.*, 2013).

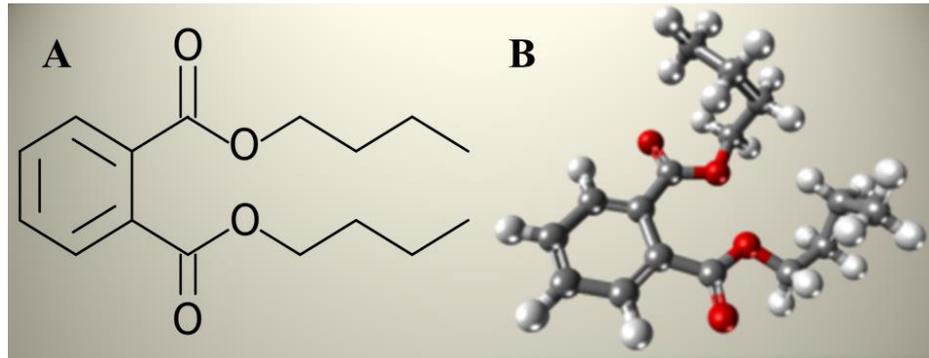
Atualmente os ftalatos são conhecidos como “Disruptores endócrinos”, pois já se conhece muito bem seus efeitos em animais humanos e não humanos (FOSTER, 2006; SHEIKH *et al.*, 2016). Logo o estudo desses contaminantes em organismos marinhos, enfatizando seus efeitos reprodutivos, é de extrema importância, uma vez que a perpetuação das espécies depende de um bom funcionamento reprodutivo. Um estudo conduzido por CORRADETTI *et al.* (2013) verificou a biologia reprodutiva do peixe-zebra masculino (*Danio rerio*) em concentrações de 0,2 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ do DEHP em 3 semanas de exposição. O DEHP induziu uma parada mitótica durante da espermatogênese do peixe-zebra, aumentando a fragmentação do DNA nos espermatozoides e reduzindo significativamente a produção embrionária em até 90%. Outro estudo com a exposição de cinco ésteres de ftalatos mostrou que a capacidade de incubação, morfogênese e metamorfose nos estágios embrionários de mexilhões é alterada negativamente e que, além disso, os ftalatos afetam a osmorregulação, danificando o envelope embrionário e causando transtorno de homeostasia fisiológica no organismo (ZHOU *et al.*, 2011).

Contudo, há muitos relatos sobre como os mais variados tipos de ésteres de ftalato podem afetar os organismos marinhos, sejam eles, aves, mamíferos, peixes ou invertebrados. No entanto a poluição por ésteres de ftalatos é crescente e vem se tornando cada vez mais onipresente (ZHANG *et al.*, 2018a; CHENG *et al.*, 2019) e os efeitos de alguns tipos de ftalatos, que são muito utilizados na indústria, ainda não são totalmente compreendidos em seu contexto químico e biológico. O presente estudo tem foco em apenas um ftalato devido à falta de literatura sobre os efeitos desse contaminante no ambiente marinho

2.3.1 Dibutil ftalato e seus efeitos em organismos aquáticos

O Dibutil ftalato (DBP), também chamado de D-n-butil ftalato (Figura 5), é um plastificante muito utilizado em setores industriais, tendo seu foco na indústria cosmética. Todavia, muitos países já tem seu uso restrito por ele estar incluso no grupo dos disruptores endócrinos (MANIKKAM et al., 2013), ou seja, pode afetar o sistema hormonal de diversos organismos de diferentes níveis tróficos (PORTE et al., 2006). Amostras coletadas de água e sedimento em algumas regiões do mundo mostram que o DBP está presente em diferentes compartimentos ambientais (JOHNSON et al., 1984; FROMME et al., 2002). Ainda mais, o DBP tende a se concentrar mais em fundo de rios e estuários do que na superfície da água (ZHANG et al., 2018a). É considerado onipresente e dominante em diversas regiões de mundo, como por exemplo, Alemanha (FROMME et al., 2002), China (HUANG et al., 2008) e países baixos (PEIJNENBURG & STRUIJS, 2006), tendo a variação de concentração em água doce e marinha de 0,12 a 8,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e em sedimentos de 0,06 a 20,8 mg kg^{-1} . (FROMME et al., 2002; ZHANG et al., 2018b). Essas concentrações podem ser tóxicas para diversos organismos, como por exemplo, *Artemia salina*, o qual diminuiu drasticamente sua eclosão dos ovos, após a exposição ao DBP por 72 h, nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SUGAWARA, 1974). Outro estudo verificou que a exposição ao DBP induziu a disfunção espermática do poliqueta *Galeolaria caespitosa*. Logo após a primeira clivagem um blastômero em embriões anormais realizou outras mitoses enquanto um ficava retido. Em análise de microtúbulos verificou-se que os fusos mitóticos nos embriões anormais eram dobrados e encurtados sendo incapazes de ancorar o corte, resultando na segregação defeituosa dos cromossomos, entre outras anormalidades encontradas (LU et al., 2017). No entanto ainda falta literatura com foco no DBP em organismos marinhos para melhor entendimento de como esse contaminante pode afetar a vida desses animais e suas relações. Para isso há uma grande necessidade de organismos modelos que possam contribuir com a rapidez e baixo custo experimental.

Figura 5 – Estrutura molecular simples (A) e em 3D (B) do Dibutil ftalato.



Fonte: Imagens retiradas do google imagens (2019).

2.4 NEMATOIDES COMO BIOMODELOS PARA ESTUDOS EXPERIMENTAIS

A meiofauna é um conjunto de metazoários composto de aproximadamente 30 Filos zoológicos, sendo o Filo Nematoda o mais abundante (JESUS, 2014). A comunidade meiofaunal foi classificada levando em consideração o hábitat e a dimensão dos organismos (0,44 a 0,5 mm) (MARE, 1942). A meiofauna é um componente fundamental do bentos costeiro e contribui significativamente para a transferência de energia nos níveis tróficos (DANOVARO *et al.*, 2007; KRAMER *et al.*, 2013). Além disso, os membros da comunidade pertencentes à meiofauna podem ser uma ferramenta útil para estudos sobre impactos humanos, pois respondem de forma rápida às mudanças que ocorrem no meio ambiente (KENNEDY & JACOBY, 1999; GIENE, 2008).

Os nematoides são os metazoários mais diversos e numericamente dominantes em ambientes marinhos, ocorrem em qualquer tipo de sedimento, em diferentes condições climáticas e em ambientes com elevadas concentrações de poluentes (FLEEGER & CHANDLER, 1983; KENNEDY & JACOBY, 1999). Além disso, os nematoides vivem em contato direto com os componentes dissolvidos na água através de sua cutícula permeável (PLATT & WARWICK, 1980; VRANKEN *et al.*, 1986). Os nematoides em particular, são considerados bons indicadores de contaminação por diversas razões, que incluem a sua abundância, elevada diversidade de táxons, o curto tempo de geração, desenvolvimento bentônico direto, fácil cultivo em laboratório. Outra vantagem de se utilizar os nematoides em estudos de impactos ambientais é que mesmo com pequenos volumes de unidades amostrais

dos sedimentos, são obtidas informações com significância estatística (PLATT; WARWICK, 1980).

Os nematoides são animais adequados para serem usados em testes de toxicidade laboratorial (HÄGERBÄUMER *et al.*, 2015), também são excelentes bioindicadores (WILSON & KHAKOULI-DUARTE, 2009) de qualidade ecológica, como foi mostrado no estudo feito em ecossistemas costeiros do Mar Mediterrâneo, onde os resultados dessa pesquisa revelaram que os nematoides representam uma assembleia altamente informativa (MORENO *et al.*, 2011). Contudo, nematoides são organismos chave para o entendimento de questões ecológicas e algumas espécies em particular dão suporte para estudos experimentais de curta duração e baixo custo.

2.4.1 *Litoditis marina* como modelo biológico

O nematoide bacterívoro de vida-livre *Litoditis marina*, que pertence à família Rhabditidae, consiste em pelo menos 10 espécies crípticas (DERYCKE *et al.*, 2008; SUDHAUS, 2011). Três dessas espécies (PmI, PmII e PmIII) frequentemente são encontradas em algas marinhas, arquipélagos e depósitos na zona costeira da Bélgica e Holanda (DERYCKE *et al.*, 2005); são um complexo de espécies adequado para serem utilizados em testes ecotoxicológicos (MONTEIRO *et al.*, 2018). Ecologicamente falando, *L. marina* é uma espécie que apresenta alta tolerância às mudanças ambientais e é considerada uma espécie oportunista (BONGERS, 1990; BONGERS, 1999; BONGERS & FERRIS, 1999). Além de ser considerada, na escala colonizador-persistente (Cp), uma espécie de Cp-1 devido ao seu curto ciclo de vida (em média três dias), grande geração de prole e possuir como estratégia de vida para mudanças do meio ambiente, a Dauer Larvae. Vários trabalhos experimentais já demonstraram que esta espécie é, de fato, um ótimo modelo biológico (LIRA *et al.*, 2011; DERYCKE *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018). Um bom exemplo foi dado quando, uma pesquisa usando o metal pesado Cádmio como contaminante, mostrou que o tempo de desenvolvimento em *Pellioiditis marina*, uma das classificações antigas de *L. marina* (BASTIAN, 1865), foi alterado de 5,2 dias no controle, para 7,2 dias na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, havendo um aumento de 2 dias no seu tempo de desenvolvimento (VRANKEN *et al.*, 1985).

2.4.2 *Diplolaimelloides oschei* como modelo biológico

Diplolaimelloides oschei (Meyl, 1954) é uma espécie bacterívora e estuarina que é encontrado frequentemente em depósitos de algas marinhas (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Pertence à escala Cp-2, não tem formação de Dauer larvae e tem ciclo de vida relativamente maior em comparação a *L. marina* (14 dias). Além do mais, seu crescimento populacional não é tão rápido e a geração de sua prole é menor (BONGERS, 1999). Por ser uma espécie de Cp-2 pode mostrar-se resiliente a grandes impactos ambientais, restabelecendo suas populações após longos períodos de tempo (SOTO *et al.*, 2017). Também é considerada uma espécie biomodelo e pode contribuir com o conhecimento de como o DBP pode afetar organismos e populações de invertebrados marinhos.

3 MANUSCRITO I

Efeitos da poluição por Dibutil ftalato (DBP) nos parâmetros populacionais e embrionários dos nematoides de vida-livre *Litoditis marina* (Bastian, 1865) Sudhaus, 2011 e *Diplolaimelloides oschei* (Meyl, 1974)

Resumo

O Dibutil ftalato (DBP) é um plastificante que serve para modificar propriedades físicas de materiais plásticos. Está onipresente em ambientes marinhos e estuarinos além de possuírem alta adsorção no sedimento, no qual abriga nematoides em abundância. Logo, o presente estudo investiga exposições letais e sub-letais do DBP, verificando a capacidade do mesmo de modificar parâmetros populacionais e embrionários dos nematoides estuarinos *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei*. O DBP foi altamente tóxico para ambas as espécies já que até a menor concentração testada ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) modificou parâmetros populacionais e embrionários. Porém exposições com altas concentrações ($512 \mu\text{g mL}^{-1}$) do DBP não causaram 100% de mortalidade em nenhuma das espécies. Em comparação com outros invertebrados, os nematoides aqui investigados foram altamente tolerantes à exposição de curto prazo, porém afetados com exposições em longo prazo. Ambas as espécies apresentaram diferentes sensibilidades ao DBP e estratégias de vida.

Palavras-Chave: Ecotoxicologia; Nematoda; Plastificantes; Estéres de ftalato; Sub-letal; letal.

Abstract

Dibutyl phthalate (DBP) is a plasticizer used to modify physical properties of plastic materials. It is omnipresent in marine and estuarine environments and has high absorption in the sediment, in which nematodes are abundant. Therefore, the present study investigates lethal and sub-lethal exposures of DBP, verifying its capacity to modify population and embryonic parameters of the estuarine nematodes *Litoditis marina* and *Diplolaimelloides oschei*. DBP was highly toxic for both species since even the lowest concentration tested ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) modified population and embryonic parameters. However, exposures with high concentrations ($512 \mu\text{g mL}^{-1}$) of DBP did not cause 100% mortality in any of the species. Compared with other invertebrates, nematodes investigated here were highly tolerant of short-

term exposure, but affected with long-term exposures. Both species presented different sensitivities to DBP and life strategies.

Keywords: Ecotoxicology; Nematoda; Plasticizers; Phthalate esters; Sublethal; Lethal.

3.1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações dos ecotoxicologistas marinhos é, sem dúvida, a grande quantidade de lixo descartada no oceano. Só de materiais plásticos estima-se que a produção mundial ultrapasse mais de 335 milhões de toneladas por ano (PLASTICSEUROPE, 2017), onde mais de oito milhões de toneladas são despejadas no ambiente marinho (JAMBECK *et al.*, 2015) causando efeitos variados a organismos que nele vivem. Para ecotoxicologistas, os efeitos químicos são os que mais interessam, uma vez que, os plásticos podem liberar no ambiente marinho substâncias químicas que fazem parte de sua composição, como por exemplo, um complexo de ésteres de ftalatos, onde os mais importantes são o Dibutil ftalato (DBP); Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP), Benzil butil ftalato (BBP) e Dioctil ftalato (DOP) (HERMABESSIERE *et al.*, 2017). Além disso, essas substâncias ficam biodisponíveis no meio ambiente e podem bioacumular efeitos deletérios para diversas espécies marinhas (GOBAS *et al.*, 2003).

O Dibutil ftalato (DBP), também chamado de D-*n*-butil ftalato, é um plastificante comumente utilizado, muito importante em diversos setores industriais. Todavia, muitos países já têm seu uso restrito por ele estar incluso no grupo dos desreguladores endócrinos (MANIKKAM *et al.*, 2013), ou seja, podem afetar o sistema hormonal de diversos organismos de diferentes níveis tróficos (PORTE *et al.*, 2006). Amostras coletadas de água e sedimento em algumas regiões do mundo mostram que o DBP está presente em diferentes compartimentos ambientais (JOHNSON *et al.*, 1984; FROMME *et al.*, 2002). Ainda mais, o DBP tende a se concentrar mais em fundo de rios e estuários do que na superfície da água (ZHANG *et al.*, 2018a), além de ser onipresente e dominante em diversas regiões do mundo (FROMME *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2018b).

A onipresença do DBP em ambientes marinhos pode afetar invertebrados que vivem na água e no sedimento. É importante enfatizar que há uma relação diretamente proporcional entre a adsorção do DBP no sedimento e a salinidade, (XU & LI, 2008) o que pode comprometer diversos organismos. Um exemplo prático ocorreu quando LU *et al.* (2017) expuseram espermatozoides do poliqueta *Galeolaria caespitosa* a concentrações que variavam de 0,02 a 20 partes por milhão ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e perceberam que concentrações acima de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ comprometem a função espermática desse animal, causando uma menor taxa de reprodução. No entanto, ainda há carência de estudos com DBP em invertebrados marinhos, mesmo que eles representem uma grande importância no equilíbrio desses ambientes, pois servem como base alimentar para animais superiores na cadeia trófica (MACKINTOSH *et al.*, 2004), além de muitos desses organismos serem ótimos modelos biológicos para estudos experimentais.

Nematoides marinhos e estuarinos são usados frequentemente em estudos ecotoxicológicos (VRANKEN *et al.*, 1991; MAHMOUDI *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2011; LUANA *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2018). Essa preferência por nematoides para estudos em microcosmo (em placas de Petri) se deve por suas características morfológicas e ecológicas dadas pelo tamanho e transparência corporal, o que facilita a visualização de estruturas internas e manuseio. Além disso, muitos nematoides têm tempo de vida curto, em relação a outros animais de cadeia superior, alta taxa de descendentes, ciclo de vida curto, além da alta abundância em sedimentos (SOHLENIUS, 1980; TRAUNSPURGER *et al.*, 1997; RAES & VANREUSEL, 2006; ALVES *et al.*, 2013).

Os nematoides do gênero *Litoditis* (Rhabditidae) e *Diplolaimelloides* (Monhysteridae) são cosmopolitas, frequentemente encontrados em estuários e coexistem nos mesmos locais (DOS SANTOS *et al.*, 2008; DERYCKE *et al.*, 2016). De acordo com BONGERS & BONGERS (1998), as espécies *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei* são colonizadoras oportunistas que dependem da disponibilidade de matéria orgânica para ter crescimento populacional exponencial e ainda são tolerantes a impactos ambientais a níveis populacionais. Os mesmos autores definiram a escala Colonizador–Persistente (Cp) de acordo com o nível de oportunismo desses animais. *L. marina* foi denominada como um nematoide de Cp-1, ou seja, um extremo colonizador, tendo seus índices de população altos quando o

ambiente é rico em matéria orgânica, além disso, quando o ambiente carece de alimento, esse nematoide é capaz de formar “Dauer Larvae”, um estágio larval que reduz seu metabolismo como estratégia de sobrevivência. *Diplolaimelloides oschei* pertence à escala Cp-2, não tem formação de Dauer larvae e tem ciclo de vida relativamente maior que *L. marina*, além do mais, seu crescimento populacional não é tão rápido e a geração de sua prole é menor (BONGERS, 1999).

Logo, através da utilização dos nematoides marinhos *L. marina* e *D. oschei* como biomodelos, este trabalho objetiva identificar possíveis impactos causados pelo plastificante Dibutil ftalato em experimentos *Ex situ*. Tendo como hipóteses: 1- Exposições de curto prazo do DBP causarão mortalidade em ambas às espécies, sendo *L. marina* mais tolerante, por ser um extremo colonizador (Cp-1); 2- Concentrações sub-letais do DBP modificarão parâmetros populacionais (Tamanho da população de adultos e jovens) e de crescimento (Tempo de eclosão de ovos, crescimento de larvas e maturação) de ambas as espécies, porém espera-se que *D. oschei* seja mais afetado por ser uma espécie menos oportunista que *L. marina* (BONGERS, 1990; BONGERS & FERRIS, 1999). O presente estudo é o primeiro a investigar mudanças nos parâmetros populacionais e embrionários de nematoides estuarinos expostos a diferentes concentrações do DBP. Apesar da relevância do DBP no ambiente marinho e por sua alta adsorção no sedimento (XU AND LI, 2008), poucos estudos experimentais focalizam os impactos do DBP em invertebrados e suas possíveis consequências. Além disso, grande parte da América do sul não tem restrição de uso desses aditivos, incluindo o Brasil.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Escolha e cultivo dos biomodelos

Litoditis marina (Bastian, 1865) Sudhaus, 2011 e *Diplolaimelloides oschei* (Meyl, 1954) são espécies bacterívoras e estuarinas que são encontradas frequentemente em depósitos de algas marinhas (DERYCKE et al., 2005). Ambas as espécies foram obtidas através do laboratório de Nematologia da Universidade de Ghent, na Bélgica e são originadas do Estuário de Westerschelde, sudeste da Holanda.

As espécies já eram mantidas em culturas monoespecíficas, agnobióticas para o crescimento exponencial com temperatura de (18°C) e salinidade (25) constante. Contudo para a realização dos experimentos foi necessário um reajuste de concentração de ágar, pois *L. marina* é uma espécie que apresenta melhor estabilidade populacional em ágares mais concentrados, contrariando *D. oschei*. Por este motivo testes prévios foram realizados nas culturas com diferentes concentrações de ágar e a concentração de 0,9 % (9g de bacto-agar / L de água do mar) foi a que manteve ambas as populações em crescimento exponencial.

A justificativa de escolher ambas as espécies é que estas coexistem no mesmo ambiente, já foram utilizadas em estudos experimentais (também em nível de gênero) com boas respostas para as indagações a curto prazo e são de fácil manuseio e baixo custo de manutenção (VRANKEN *et al.*, 1991; DERYCKE *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2009; LIRA *et al.*, 2011; DE MEESTER *et al.*, 2015a). *Litoditis marina* é uma espécie críptica, que faz parte de um complexo de mais de 10 espécies, onde já foram reportadas diferenças ecológicas entre elas (DE MEESTER *et al.*, 2012; DERYCKE *et al.*, 2016). Tem curto tempo de vida (em torno de 20 dias) e chega a sua fase adulta em torno de três dias. Neste estudo foi escolhida a espécie Pm III pois já foi reportado que a mesma suporta temperaturas mais quentes e variações da mesma (DE MEESTER *et al.*, 2015a). Além disso, é uma espécie que vem apresentando bons resultados para se tornar uma espécie biomodelo, e o presente estudo também busca contribuir com essa referência. *Diplolaimelloides oschei* tem o ciclo de vida relativamente maior que *L. marina* e chega à fase adulta em torno de 14 dias. Por ser uma espécie de Cp-2 pode mostrar-se resiliente a grandes impactos ambientais restabelecendo suas populações após longos períodos de tempo (SOTO *et al.*, 2017).

3.2.2 Ftalato e solventes

O Dibutil ftalato (DBP) foi produzido pela Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) com 99% de pureza e a acetona é do tipo PA. Dados prévios e não publicados (Pela própria autora) com acetona mostraram que as populações de nematóides não eram afetadas. Porém, a alta volatilidade da acetona, deixava a formação de cristais do DBP no ágar, então para melhor solubilidade do ftalato no ágar, foi necessária a adição de um surfactante Tween 80. Outros ésteres de ftalatos (DEHP e DOP) foram testados com acetona e o Tween 80, individualmente ou em conjunto,

porém ambos ftalatos apresentaram a formação de cristais e/ou branqueamento do ágar, o que impedia a total solubilidade dos ftalatos e/ou a viabilidade dos nematoides.

3.2.3 *Preparação das concentrações do Dibutil ftalato*

O DBP foi diluído com uma solução de acetona e Tween 80 que foi preparada com a mesma concentração para todos os tratamentos, ou seja, uma solução estoque. O DBP tinha 100% de pureza, logo a concentração inicial dependia do volume do solvente. A solução estoque inicial continha 9 mL de acetona com 700 µL de Tween 80. Essa solução serviu para solubilizar o DBP e determinar as concentrações no ágar utilizado no experimento. As concentrações para os testes de letalidade (agudo) foram 16; 32; 64; 128 e 256 e 512 µg mL⁻¹. Para os testes sub-letais (Crônico) foram de 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 µg mL⁻¹. O gradiente de concentração foi baseado em estudos de análise de concentrações do DBP em água e sedimento (GAO & WEN, 2016).

3.2.4 *Preparação dos bioensaios*

Todos os experimentos foram realizados em placas de Petri de seis cm³, descartáveis e esterilizadas. Também foram testados dois controles experimentais, o controle biológico (sem solventes e/ou DBP) e o controle do solvente (Apenas solvente sem DBP). O ágar foi preparado na concentração de 0,9 %, ou seja, adicionou-se 9 g de bactó-agar em 1 L de água do mar com salinidade 25. O ágar foi homogeneizado e esterilizado, com posterior adição de 100 µL de colesterol no ágar, pois nematoides não conseguem sintetizar esteroides quando sua única fonte de alimento é bactéria (VANFLETEREN, 1980). Para conduzir o experimento, as soluções com DBP foram homogeneizadas no ágar para volume final de 5 mL nas placas de Petri. Para montagem dos testes de letalidade (agudo), em uma gota de água do mar aplicada no ágar foram adicionados 100 nematoides adultos por placa. Foram feitos tréplicas para cada tratamento. Os nematoides foram alimentados com 50 µL de sepas de *Escherichia coli* K12 morta com concentração de 3 x 10⁹ células mL⁻¹, pois essa concentração dispõe melhores condições para o crescimento populacional dos nematoides utilizados (DOS SANTOS *et al.*, 2008). As placas foram vedadas com parafilm e armazenadas em incubadoras a 18°C e no escuro. Apenas nematoides mortos e vivos foram contados a cada 24 horas no período de cinco dias para análise de mortalidade. Nematoides que nasceram durante o experimento não foram contados. Para montagem de testes sub-letais, após o ágar enrijecido, aplicou-se uma gota de água do mar na qual foram

colocados oito machos e oito fêmeas de *L. marina* ou *D. oschei*, individualmente. A cada 10 dias os nematoides eram alimentados novamente com 50 µL de sepas de *E. coli* na concentração de 3×10^{-9} células mL⁻¹. As placas foram vedadas e armazenadas em incubadoras a 18° C, no escuro. Os parâmetros de Oviposição diária, Tempo de desenvolvimento total (TDT), Tempo de eclosão de ovos (TEO) e Tempo de maturação (TDM) (MOENS & VINCX, 2000) e crescimento populacional puderam ser analisados através da contagem de ovos, jovens, fêmeas e machos que ocorreram a cada 24 horas durante 15 dias para experimento com *L. marina* e a cada 48 horas durante 28 dias para experimentos com *D. oschei*. Os parâmetros foram baseados em MOENS & VINCX (2000) com pequenas modificações nos nomes.

3.2.5 Cálculo dos parâmetros

Todos os dados foram transferidos para uma planilha eletrônica. Através do teste de letalidade foi calculada a concentração letal 50 (CI50) com a estimativa de probabilidades (Probit). Os parâmetros embrionários e populacionais dos testes sub-letais (Quadro 1) também foram calculados por modelagem do crescimento populacional regressão linear. A população de adultos foi calculada pelo somatório da população de machos + população de fêmeas, evitando estágios larvares sem desenvolvimento do aparelho reprodutor. A população total foi calculada pelo somatório da população de jovens + adultos, sem a inclusão de ovos. Os parâmetros de tempo foram calculados através de uma tendência linear (Regressões). Essas regressões estimam o tempo de crescimento dos nematoides através do aparecimento de ovos, jovens e adultos que são conferidos através das contagens. Para análise de crescimento populacional total (Adultos + Jovens), de adultos e de jovens foram utilizados os dados da Área sob a curva (ASC) calculados da regra do trapézio (HANLEY & MCNEIL, 1982).

3.2.6 Análise de dados

Todos os parâmetros foram analisados através do software PRIMER v6 pelo teste não-paramétrico de Análise de Variância multivariada Permutacional (PERMANOVA) por não atenderem às premissas de variância paramétrica. Os dados eram analisados entre tratamentos e réplicas. Os dados foram baseados em distância Euclidiana com 9999 permutações e posteriormente transformados em raiz (4) para padronização. A diferença significativa entre os tratamentos foi assumida com 95% de

confiança posteriormente tratadas pelo PERMDISP para testar se a homogeneidade das dispersões foi definida pelos tratamentos ou pelas réplicas. Quando definidas pelas réplicas, análise de Escalonamento multidimensional (MDS) foi rodada para identificar a distância entre tratamentos e réplicas. Quando definida pelos tratamentos, os dados que assumiam $p < 0,05$ e o número de permutações era inferior a 150, o teste Monte Carlo era utilizado para discriminar a diferença entre os tratamentos (ALVES *et al.*, 2013). Os gráficos foram plotados pelo programa Sigmaplot V.12.5.

Quadro 1 - Cálculo e forma de análise de todos os parâmetros analisados no presente estudo, para as espécies *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei*. (ASC) = Área abaixo da curva.

Quadro 1- Cálculo e forma de análise de todos os parâmetros analisados no presente estudo, para as espécies *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei*. (ASC) = Área abaixo da curva.

Parâmetros		Cálculo	Análise
Parâmetros populacionais	População Total	ASC de Adultos + ASC de jovens	Estimativa da quantidade de nematoides por placa
	População de nematoides jovens	ASC de jovens	Estimativa da quantidade de nematoides jovens por placa
	População de Nematoides adultos	ASC de adultos	Estimativa da quantidade de nematoides adultos por placa
	Oviposição diária	Média das réplicas do número de ovos/ Total de dias contados	Número de ovos depositados
Parâmetros de crescimento	Tempo de desenvolvimento total	Regressão da contagem de ovos + Regressão da contagem de adultos	Estimativa do tempo em que o nematoide chega à fase adulta depois que o ovo é depositado
	Tempo de eclosão dos ovos	Regressão da contagem de jovens - Regressão da contagem de ovos	Estimativa do tempo em que o nematoide eclode do ovo após o mesmo ser depositado
	Tempo de maturação	Regressão da contagem de adultos - Regressão da contagem de jovens	Estimativa do intervalo de tempo em que o nematoide sai do ovo e chega à fase adulta

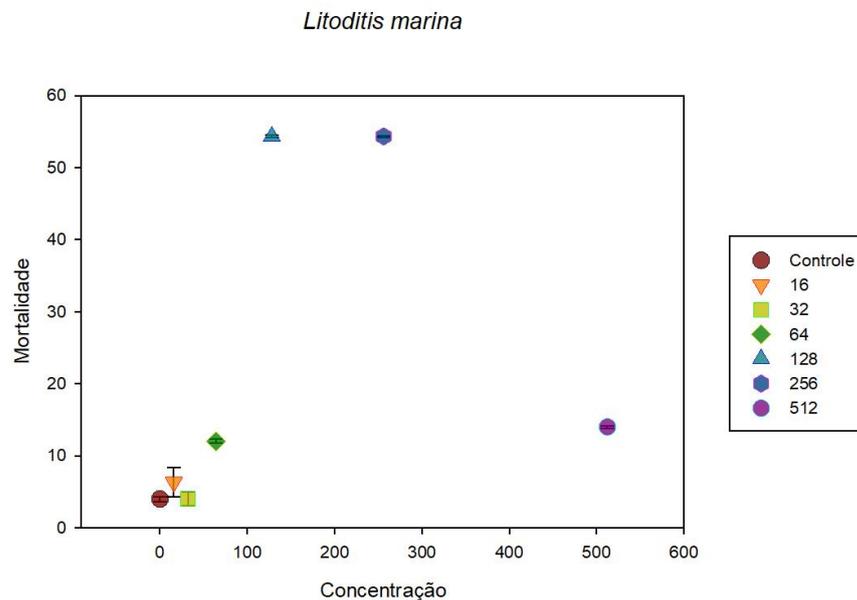
3.3 RESULTADOS

3.3.1 *Litoditis marina*

3.3.1.1 Teste de Letalidade

A toxicidade aguda do DBP em *L. marina* foi estimada após 120 horas de exposição. Através da estimativa de Probit a CI50 foi estimada em 891, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém como não houve mortalidade de 100% em nenhum dos tratamentos, este resultado não é preciso, além do mais, não foi observado padrão de aumento de mortalidade em relação às concentrações (Figura 6). No último dia de experimento foram observados nematoides jovens em todas as concentrações mostrando que a exposição de cinco dias com as concentrações testadas não foram suficientes para impedir a reprodução do animal.

Figura 6 – Taxa de Mortalidade (Número bruto) de *Litoditis marina* após 120 horas de exposição ao Dibutil ftalato. As concentrações são dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$.



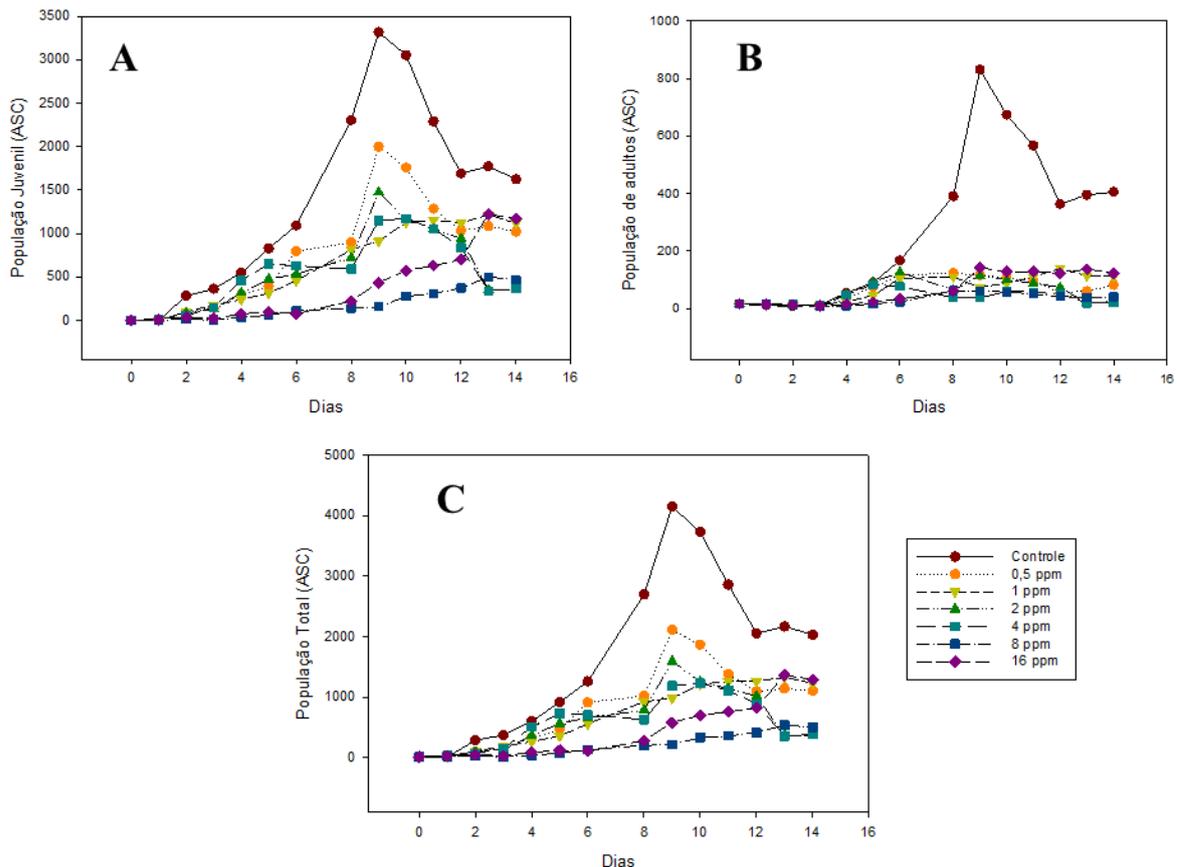
3.3.1.2 Testes sub-letais

Para *L. marina* o controle biológico e o controle solvente não tiveram diferença significativa em nenhum dos parâmetros (PERMANOVA, Valor de $p > 0,05$)

e como isso em todo esse capítulo será considerado apenas o controle solvente para os testes estatísticos.

O tamanho da população total (Figura 7) apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Pseudo-F = 39,71 e $p = 0,0001$) e a diferença entre os tratamentos não foi causada por dispersão (PERMDISP, Valor de $p = 0,57$). Todas as concentrações diferiram estatisticamente do controle (PERMANOVA, valor de $p < 0,05$) podendo ser observadas diferenças no tamanho populacional entre os tratamentos (Figura 7). A menor concentração de DBP já apresentou efeito em relação ao tamanho da população quando comparado ao controle. Observa-se uma tendência de quanto maior a concentração menor é o tamanho populacional.

Figura 7 - Crescimento populacional de A- Nematoides jovens, B- Adultos e C- População total de *Litoditis marina*, ao longo do tempo (dias) calculado pela Área sob a curva (ASC).



A população de jovens (Figura 7) também diferiu entre os tratamentos (Pseudo-F = 39,99 e $p = 0,0001$), e os dados não apresentaram dispersão (PERMDISP, Valor de $p = 0,52$). Todas as concentrações diferiram do controle (PERMANOVA, Valor de $p = 0,05$).

Valor de $p < 0,05$). O menor tamanho populacional de jovens em relação ao controle pode ser observado na concentração de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostrado na figura 7.

A população de adultos também apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Pseudo-F = 39,96 e $p = 0,0001$) e os dados também não apresentaram dispersão (PERMDISP, Valor de $p = 0,57$). Utilizando o teste por pares, foi identificada diferença significativa de todos os tratamentos em relação ao controle (Valor de $p < 0,05$).

As taxas de Oviposição diária (Tabela 1) de *L. marina* também apresentaram diferença estatística (Pseudo-F = 38,28 e $p = 0,0001$). Os dados não apresentaram dispersão entre as amostras (PERMDISP, Valor de $p = 0,36$). A comparação por pares mostrou que todos os tratamentos diferem estatisticamente do controle (Valor de $p < 0,05$).

Os tempos de desenvolvimento podem ser observados na tabela 1. No experimento notou-se que *L. marina* apresentou alta taxa de viviparidade e por este motivo o tempo de eclosão de ovos não pode ser calculado.

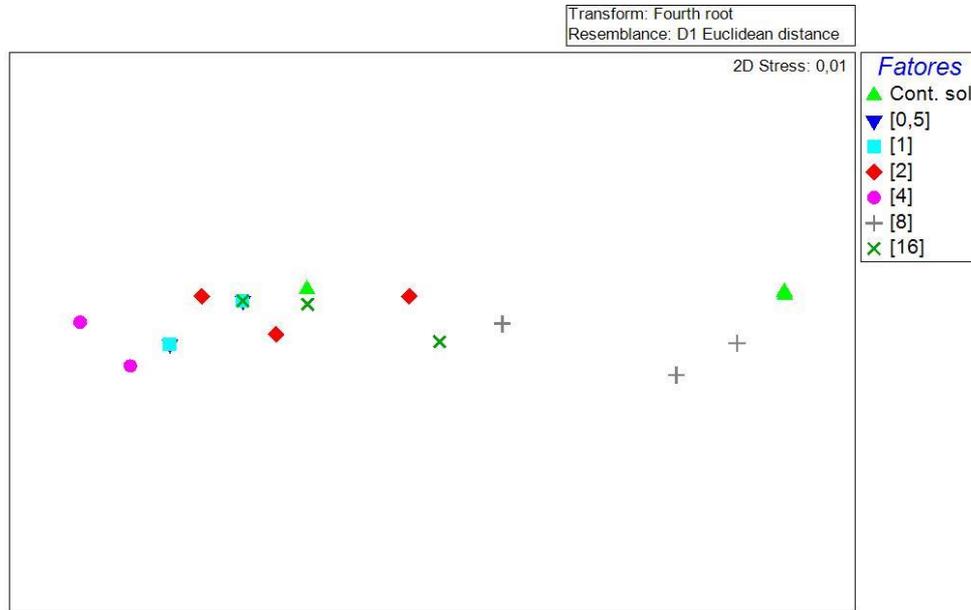
Tabela 1 - Média e Erro Padrão do Tempo de desenvolvimento total (TDT), Tempo de maturação (TDM), em dias, e Oviposição diária de *Litoditis marina* em diferentes tratamentos do DBP. O Tempo de eclosão de ovos (TDE) não pode ser definido devido à baixa oviparidade que *L. marina* apresentou. (*) refere-se aos parâmetros que diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$).

Média ± Erro Padrão				
Tratamento	TDT	TDM	TDE	Oviposição diária
Controle	$4,9 \pm 0,44$	$1,6 \pm 0,15$	-	$44 \pm 11,28$
$0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$	$3,6 \pm 0,43$	$1,2 \pm 0,1$	-	$94 \pm 8,3^*$
$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	$3,6 \pm 0,46$	$0,5 \pm 0,12$	-	$23 \pm 5,6^*$
$2 \mu\text{g mL}^{-1}$	$3,8 \pm 0,49$	$1,1 \pm 0,07$	-	$62 \pm 14,83^*$
$4 \mu\text{g mL}^{-1}$	$3,3 \pm 0,1^*$	$0,6 \pm 0,12^*$	-	$109 \pm 18,32^*$
$8 \mu\text{g mL}^{-1}$	$4,9 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,08$	-	$98 \pm 2,47^*$
$16 \mu\text{g mL}^{-1}$	$3,9 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,3$	-	$90 \pm 19,39^*$

O tempo de desenvolvimento total no controle foi de 4,9 dias e teve diferença significativa entre os tratamentos (Pseudo-F = 6,58 e $p = 0,002$), porém os dados mostraram dispersão entre amostras (PERMDISP, Valor de $p = 0,02$), que não condizem com o tratamento que diferiu do controle, mostrado pelo MDS (Figura 8). O teste por pares mostrou que apenas a concentração de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ diferiu do controle e

esse resultado mostrou que houve uma maturação mais rápida nessa concentração em relação ao controle.

Figura 8 - MDS do Tempo de desenvolvimento Total de *L. marina*. Os fatores referem-se aos tratamentos. As concentrações são dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: Autor.

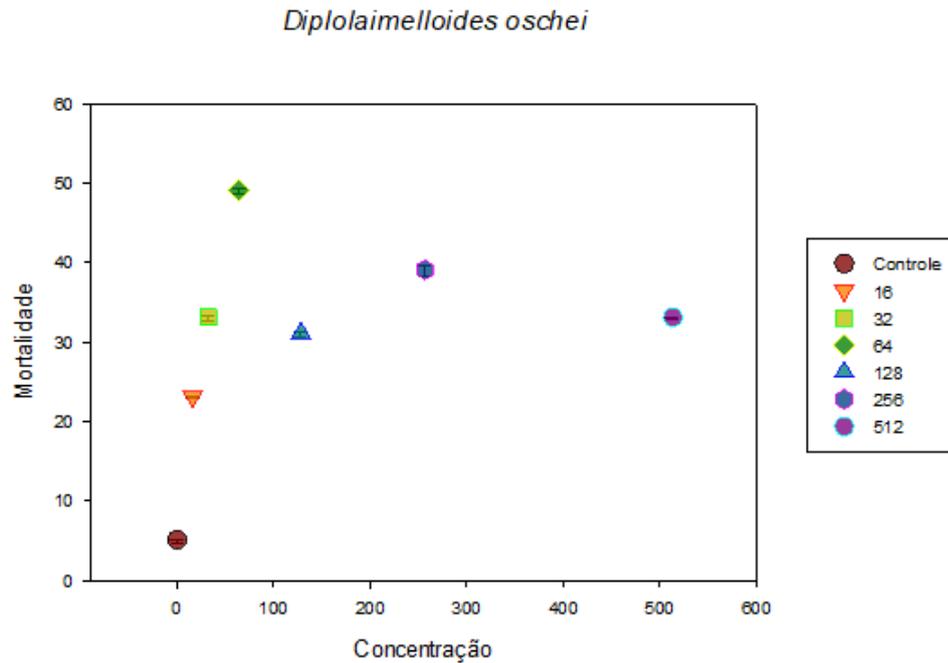
O tempo de maturação diferiu estatisticamente dos tratamentos (Pseudo-F = 3,02 e $p = 0,03$) e o dados do PERMDISP não apresentaram dispersão entre os tratamentos (PERMDISP, valor de $p = 0,5$). A análise entre pares apenas identificou diferença estatística entre o controle e a concentração de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PERMANOVA, Valor de $p < 0,05$).

3.3.2 *Diplolaimelloides oschei*

3.3.2.1 Teste de Letalidade

A CI50 do DBP para *D. oschei* foi estimada em $100.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essa alta estimativa pode ser explicada porque em nenhum dos tratamentos houve mortalidade de 100% para populações de *D. oschei*, dificultando uma estimativa mais precisa, além do mais não foi observado padrão de aumento de mortalidade em relação às concentrações (Figura 9). No último dia de experimento não foram observados ovos ou juvenis nos tratamentos com o DBP, apenas no controle foram observados ovos e poucos juvenis, porém não foram contabilizados por não fazerem parte das análises.

Figura 9 - Taxa de Mortalidade (Valor bruto) de *Diplolaimelloides oschei* após 120 horas de exposição ao Dibutil ftalato. As concentrações são dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$.



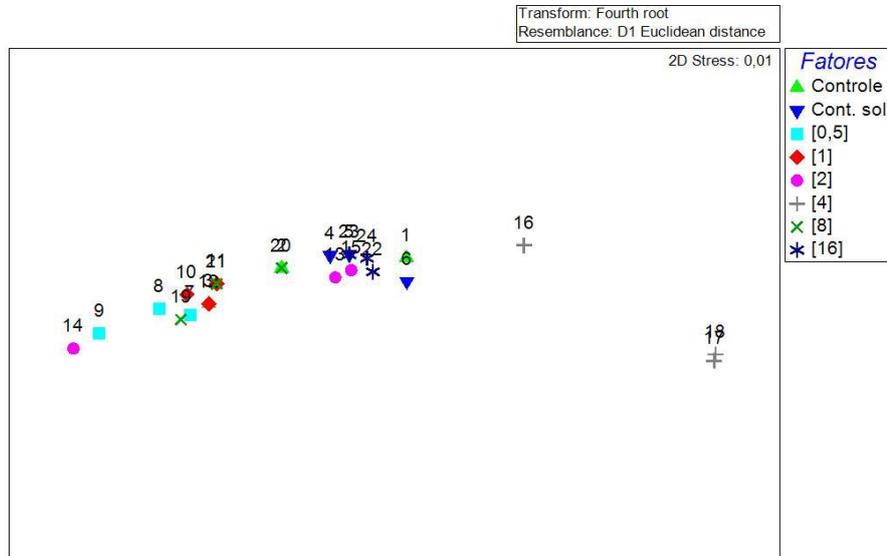
Fonte: Autor.

3.3.2.2 Teste sub-letal

Para *D. oschei* não houve diferença estatística entre os controles biológicos e do solvente (PERMANOVA, $p\text{-valor} > 0,05$) e todos os tratamentos foram comparados apenas com o controle do solvente.

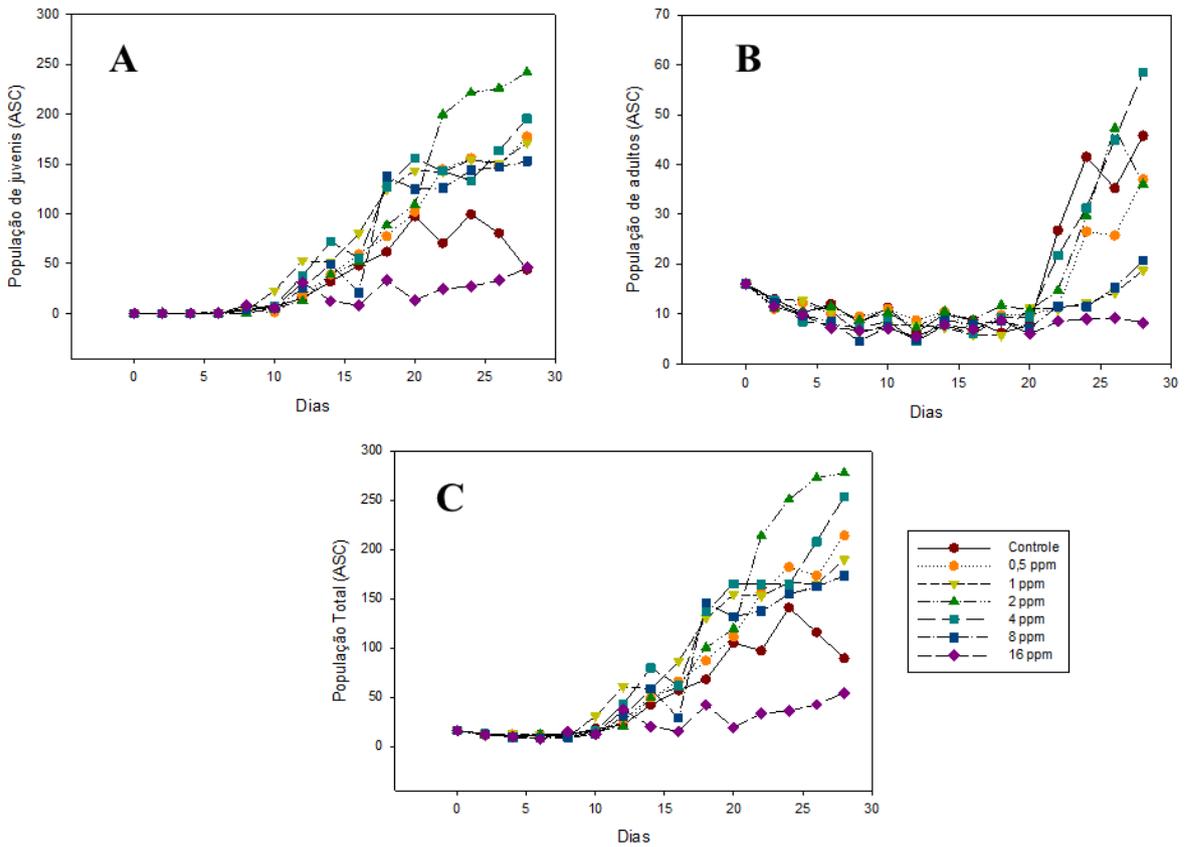
O tamanho da população total de *D. oschei* (Figura 10) foi estatisticamente diferente entre os tratamentos (Pseudo-F = 19,3 e $p = 0,0001$). Os dados apresentaram dispersão de dados (PERMDISP, valor de $p = 0,02$) e são mostrados no MDS na figura 10. A comparação por pares mostrou diferença estatística entre os tratamentos de 1; 2; 4 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PERMANOVA, Valor de $p < 0,05$) porém o tamanho das populações dos referentes tratamentos não se distinguem, sendo as populações aparentemente iguais em todos os tratamentos.

Figura 10 - MDS da População total de *D. oschei*. Os fatores referem-se aos tratamentos. As concentrações são dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$. A numeração indica o número das amostras em ordem de tratamento, ou seja, o controle com 3 réplicas estão inumeradas de 1 a 3. O controle solvente com 3 réplicas, estão inumeradas de 4 a 6 e assim progressivamente.



Fonte: Autor.

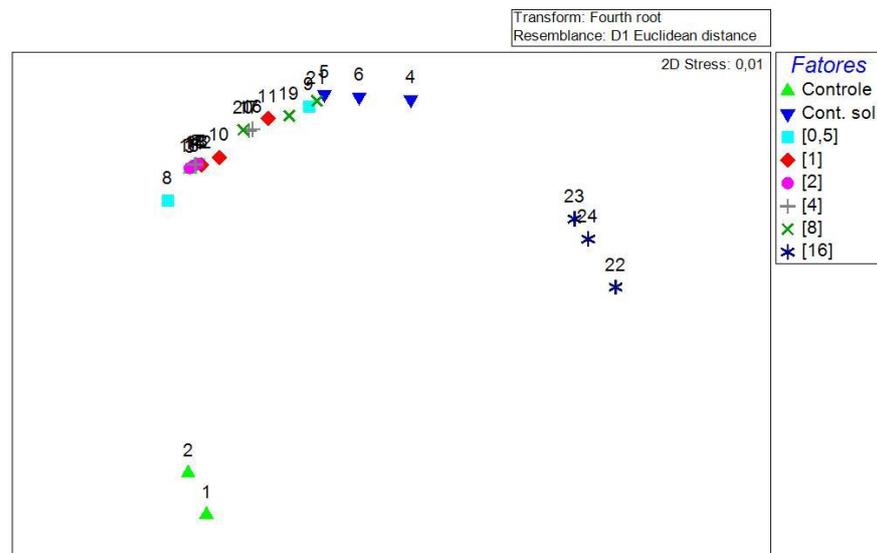
Figura 11 - Crescimento populacional de A- Nematoides jovens, B- Adultos e C- População total de *Diplolaimelloides oschei*, ao longo do tempo (dias) calculado pela Área sob a curva (ASC).



Fonte: Autor.

A população de nematoides juvenis de *D. oschei* também teve diferença estatística entre os tratamentos (Pseudo-F = 16,79 e $p = 0,0001$). Os dados apresentaram dispersão (PERMDISP, valor de $p = 0,02$) e os testes de comparação por pares entre os tratamentos mostraram diferença estatística para as concentrações de 1; 2; 4 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PERMANOVA, Valor de $p < 0,05$).

Figura 12 - MDS da População de jovens de *D. oschei*. Os fatores referem-se aos tratamentos. As concentrações são dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$. A numeração indica o número das amostras em ordem de tratamento, ou seja, o controle com 3 réplicas estão inumeradas de 1 a 3. O controle solvente com 3 réplicas, estão inumeradas de 4 a 6 e assim progressivamente.



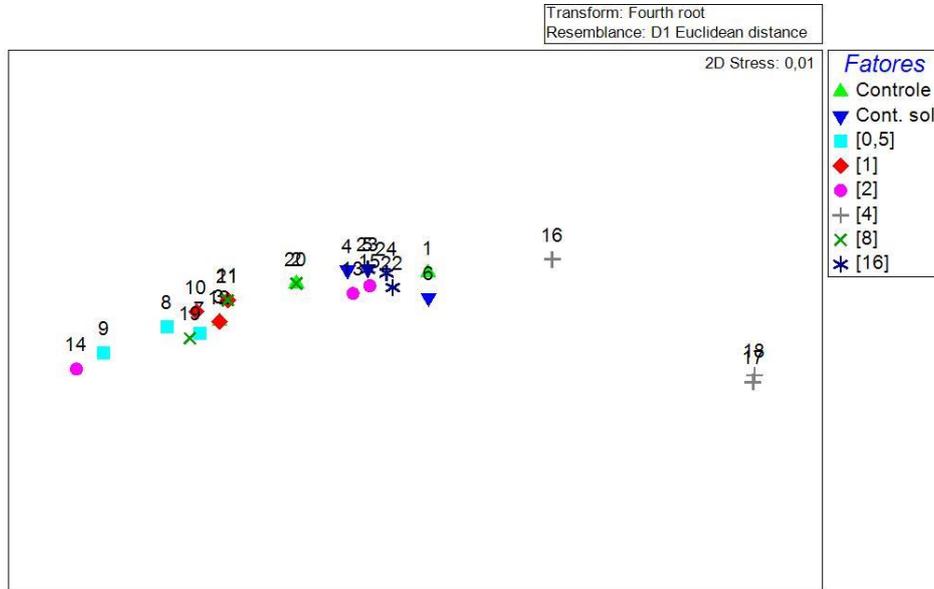
Fonte: Autor.

A população de adultos de *D. oschei* também teve diferença estatística entre os tratamentos (Pseudo-F = 22,02 e $p = 0,0001$), mas essa diferença só ocorreu entre os controles biológico e solvente. Os dados não apresentaram dispersão (PERMDISP, valor de $p = 0,07$).

A Oviposição diária teve diferença estatística entre os tratamentos (Pseudo-F = 27,73 e $p = 0,0001$) e os dados não apresentaram dispersão (PERMDISP, valor de $p = 0,7$). A comparação entre pares de tratamentos mostraram diferença significativa entre os tratamentos de 0,5 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O tempo de desenvolvimento total (Tabela 2) teve diferença estatística entre os tratamentos (Pseudo-F = 10,44 e $p = 0,0002$). Os dados apresentaram dispersão entre os tratamentos mostrados na figura 13 (PERMDISP, valor de $p = 0,03$). No entanto, a comparação entre pares de tratamentos evidenciaram diferença estatística nas concentrações de 0,5; 1; 4 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 13 - MDS do Tempo de desenvolvimento total de *D. oschei*. Os fatores referem-se aos tratamentos. As concentrações são dadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$. A numeração indica o número das amostras em ordem de tratamento, ou seja, o controle com 3 réplicas estão inumeradas de 1 a 3. O controle solvente com 3 réplicas, estão inumeradas de 4 a 6 e assim progressivamente.



Fonte: Autor.

Tabela 2 - Média e Erro Padrão do Tempo de desenvolvimento total (TDT), Tempo de maturação (TDM), Tempo de eclosão de ovos (TDE) e Oviposição diária de *Diplolaimelloides oschei* em diferentes tratamentos do DBP. (*) refere-se aos parâmetros que diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$)

Média ± Erro Padrão				
Tratamento	TDT	TDM	TDE	Oviposição diária
Controle	21,63 ± 0,1	18,1 ± 0,07	3,5 ± 0,13	14,97 ± 1,66
0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	22,96 ± 0,1*	19,4 ± 0,12	3,5 ± 0,13	28,22 ± 1,95*
1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	22,6 ± 0,05*	18,7 ± 0,1	3,9 ± 0,08	20,23 ± 1,95
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	22,6 ± 0,5	16,1 ± 0,48*	6,5 ± 0,05*	11,35 ± 2,15
4 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20,3 ± 0,34*	14,3 ± 0,05*	6,2 ± 0,3*	18,39 ± 1,82
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	21,4 ± 0,17*	16,3 ± 0,28*	5,1 ± 0,11*	14,71 ± 1,81
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	21,9 ± 0,02	16,5 ± 0,07*	5,4 ± 0,05*	7,84 ± 0,84*

Os tempos de eclosão de ovos diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Pseudo-F = 37,16 e $p = 0,0001$). Os dados não apresentaram dispersão entre as amostras (PERMDISP, valor de $p = 0,26$). A análise de comparação por pares

de tratamentos revelaram diferença estatística do controle e as concentrações acima de 2; 4; 8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os tempos de maturação diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Pseudo-F = 49,87 e $p = 0,0001$). Os dados apresentaram dispersão entre as amostras (PERMDIPS, Valor de $p = 0,04$), porém as análises de comparação por pares evidenciaram diferença estatística entre todos os tratamentos (PERMANOVA, valor de $p < 0,05$), exceto da concentração de 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A tabela 3 a seguir mostra o resumo dos resultados com ambas as espécies.

Tabela 3 - Resumo dos resultados dos parâmetros populacionais e embrionários de ambas as espécies modificados após 14 e 28 dias de exposição ao Dibutil ftalato em *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei*, respectivamente. Os tratamentos são dados em $\mu\text{g mL}^{-1}$. (*) O Tempo de eclosão de ovos não pode ser comparado porque *L. marina* não teve seu tempo de eclosão de ovos estabelecido devido à alta taxa de viviparidade e tempo de oviposição inferior a um dia.

Parâmetros	Espécie	
	<i>Litoditis marina</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Diplolaimelloides oschei</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Lc50	891, 25	100.000
População Total	Todos os tratamentos	1; 2; 4 e 16
População Jovens	Todos os tratamentos	1; 2; 4 e 16
População Adulto	Todos os tratamentos	Nenhum
Oviposição diária	Todos os tratamentos	0,5 e 16
Tempo de desenvolvimento total	4	0,5; 1; 4 e 8
Tempo de eclosão de ovos	Não pode ser calculada	2; 4; 8 e 16
Tempo de maturação	4	0,5; 1; 2; 4; 16

3.4 DISCUSSÃO

Os parâmetros populacionais e de crescimento aqui analisados foram determinantes para a compreensão do funcionamento populacional de *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei* quando expostas ao DBP. Através da contagem de ovos, nematoides jovens e adultos, foi possível verificar que o DBP, mesmo que em pequenas concentrações, prejudicou o tempo de crescimento e o tamanho das populações. Além disso, concentrações que causaram efeito negativo para as espécies, são frequentemente encontradas no meio ambiente (FROMME *et al.*, 2002). Contudo, é importante enfatizar que mesmo expostas a altas concentrações do DBP (Superiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), nenhuma das espécies teve 100% de mortalidade. Todavia, o presente estudo mostrou que ambas as espécies apresentaram modificações em seus parâmetros em pequenas concentrações. Apesar do conhecimento de que a toxicidade do DBP aumenta em maiores salinidades e conseqüentemente sendo mais adsorvido no sedimento (XU & LI, 2008), podendo prejudicar espécies que no sedimento vivem, a maioria dos estudos com DBP em organismos são concentrados em vertebrados marinhos e invertebrados de água doce (ADAMS *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1999; AOKI *et al.*, 2011). Por este motivo a comparação entre os efeitos do DBP com invertebrados marinhos e estuarinos tornou-se pouco frequente.

3.4.1 Efeito letal do Dibutil ftalato

Para letalidade o DBP mostrou toxicidade para *Litoditis marina*, mesmo não havendo letalidade de 100% em nenhuma das concentrações testadas, resultado que também ocorreu para as populações de *D. oschei*. Um estudo feito por ADAMS *et al.* (1995) mostrou a toxicidade de 14 ésteres de ftalatos em biomodelos de vertebrados e invertebrados aquáticos. Seus resultados com DBP mostraram que as CL_{50} estimadas foram inferiores a $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, para camarões e *Daphnia magna*, sendo 0,5 e $2,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. O presente resultado mostra que *L. marina*, assim como *D. oschei*, tiveram uma alta tolerância ao DBP, não sendo possível estimar com maior precisão as concentrações letais. Isto pode ser explicado quando nematoides em

salinidades mais altas reduzem suas taxas metabólicas e por esse motivo ingerem menores quantidades alimentares (MOENS & VINCX, 2000b).

Dados de concentrações de efeito não-observado (CENO) e Concentrações de efeito mínimo (CEM) não puderam ser estimados devido à alta tolerância de ambas as espécies com o DBP e pelos dados não apresentarem efeitos monotônicos.

3.4.2 Efeitos sub-letais do Dibutil ftalato

As populações de jovens e adultos de *L. marina* foram modificadas em todas as concentrações testadas em relação ao controle. Os primeiros juvenis apareceram já no primeiro dia de contagem, mas foi notório observar que as concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tiveram uma população de jovens alta logo no primeiro dia, em relação aos outros tratamentos. Após o décimo dia de contagem as populações atingiram a capacidade de suporte em todas as concentrações, não sendo mais observado crescimento exponencial em nenhum dos tratamentos até o último dia de contagem. Os primeiros adultos apareceram no quarto dia de contagem podendo ser observado um aumento populacional bem maior no controle em relação aos outros tratamentos. Já para *D. oschei* apenas as populações de jovens diferiram do controle, tendo aumento populacional nas concentrações de 1; 2 e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e diminuição populacional na concentração de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A população de adultos não teve diferença estatística entre os tratamentos, no entanto é possível observar uma notória diferença de tamanho populacional entre o controle, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as duas menores concentrações (Figura 7) onde houve uma redução drástica de adultos. Esse resultado sugere que os jovens na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não chegaram a fase adulta, já que o tamanho populacional de adultos foi bastante reduzido e nas menores concentrações os poucos jovens que nasceram chegaram a fase adulta.

Um estudo realizado com rotíferos testou uma grande escala de concentração do DBP que variou de 0,005 a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O DBP causou decréscimo no tamanho populacional nas concentrações entre 0,5 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em um período de três dias (LAN-LAN *et al.*, 2007). Aqui os nematoides foram testados durante 14 e 28 dias de exposição para *L. marina* e *D. oschei*, respectivamente, porém

o decréscimo populacional foi evidente em *L. marina* em todas as concentrações testadas enquanto *D. oschei* parece que foi beneficiado com as menores concentrações de DBP em relação ao seu tamanho populacional. Esse resultado corrobora com um estudo elaborado por WANG *et al.* (2006), que testou densidades de cianobactérias expostas ao DBP, onde pequenas concentrações foram importantes para estimular o crescimento populacional evidenciando o efeito hormese. O estudo já citado por LAN-LAN *et al.* (2007) também corroborou esse resultado, porém com outro ftalato de cadeia pequena e baixo peso molecular, o BBP, que aumentou o tamanho populacional de rotíferos em um mesmo gradiente de concentração e esse aumento populacional é relacionado com a alta taxa de Oviposição que esses organismos apresentaram. Contudo, vale salientar que, apesar de *L. marina* ser mais tolerante a variações ambientais que monhysterídeos (BONGERS, 1999; BONGERS & FERRIS, 1999), rhabditídeos no geral tem a ingestão alimentar mais aleatória (VRANKEN *et al.*, 1988) e a alimentação de *D. oschei* é mais seletiva (DOS SANTOS *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2009). Logo o que pode ter ocorrido no presente resultado é que *L. marina* ingeriu uma maior quantidade de DBP que pode ter causado uma maior toxicidade em relação ao crescimento populacional, no entanto, há necessidade de estudos mais específicos para corroborar com essa hipótese.

Sabe-se que ésteres de ftalatos são denominados desreguladores endócrinos e seu mecanismo de ação já é bastante conhecido em vertebrados (LEE & VEERAMACHANENI, 2005b; MANKIDY *et al.*, 2013; VÉLEZ *et al.*, 2015), porém ainda hoje não se sabe como o DBP pode afetar grupos de invertebrados marinhos e estuarinos em relação a taxas de Oviposição. Em relação à Oviposição, as espécies aqui investigadas apresentaram suas taxas modificadas pelo DBP. Para *L. marina* a média de ovos depositados ao dia, sem a exposição do DBP foi de 44,6 (Tabela 1) e para *D. oschei* 14,7 (Tabela 2). Em relação ao controle, as duas espécies aqui investigadas tiveram suas taxas aumentadas na menor concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém apresentaram estratégias diferentes no gradiente de aumento de concentração. *Litoditis marina* reduziu drasticamente para 23 ovos/ dia em 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e teve aumento de 62 ovos, ultrapassando o controle, em 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aumentando assim a oviviparidade e até viviparidade, pois as fêmeas mantiveram o embrião por mais tempo dentro do seu corpo. Enquanto que *D. oschei* na concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aumentou sua taxa, em relação ao controle, e logo apresentou queda entre as

concentrações de 0,5 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de 28 ovos/dia para 11 respectivamente. Porém a partir de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a oviposição diminuía ao passo que a concentração aumentava para ambas as espécies, entretanto, mesmo que a oviposição de *L. marina* teve decaído com o aumento da concentração, essas taxas ainda sim foram maiores que as do controle. *Diplolaimelloides oschei* é uma espécie que não apresenta viviparidade como estratégia reprodutiva, logo, a menor concentração, que aumentou a oviposição do mesmo, foi uma estratégia de aumentar a progênie para tentar manter o sucesso reprodutivo e populacional dessa espécie.

Uma importante observação a se fazer é que *Litoditis marina* (Pm III) é uma espécie que pode apresentar como estratégia de reprodução a oviparidade e viviparidade e no presente estudo, a espécie apresentou ambas as estratégias, porém muito mais evidente a alta taxa de viviparidade. Isso foi notado, pois o número de juvenis foi muito superior ao número de ovos depositados. A vantagem de ser um nematoide vivíparo é que as fêmeas podem proteger os ovos da exposição do DBP, porém a mudança de estratégia reprodutiva é relacionada com estressores ambientais (BLACKBUM, 1999; DE MEESTER *et al.*, 2015a), que podem ser ocasionados pela poluição. Neste experimento foi possível observar uma possível relação entre as taxas de viviparidade e aumento populacional. Enquanto que *D. oschei* é ovíparo, teve crescimento populacional de juvenis em todas as concentrações, exceto na maior (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), porém diminuição no número de adultos, o que significou maior sensibilidade dos jovens. *Litoditis marina* teve alta taxa de viviparidade e apresentou diminuição no crescimento populacional de juvenis e conseqüentemente em adultos. Mas ao que parece, os jovens de *L. marina* que sobreviveram chegaram a fase adulta, mostrando que os sobreviventes tiveram maior tolerância ao DBP. Um estudo realizado com embriões de rãs (*Xenopus Laevis*) mostrou que uma mesma escala de concentrações testada com DBP foi muito importante para determinar a sobrevivência de embriões da espécie. A concentração máxima testada (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduziu a população de embriões da rã em 50%. Nenhum dos tratamentos identificou 100% de mortalidade, no entanto os embriões apresentaram más-formações em sua estrutura corporal (LEE *et al.*, 2005). Dada as ressalvas acima pode-se concluir que a estratégia de viviparidade de *L. marina*, protegeu os ovos por mais tempo da exposição ao DBP e por este motivo os jovens podem ter nascido livres de contaminação, o que demorou mais a serem afetados pelo contaminante, chegando assim a fase adulta. Entretanto a

exposição de ovos de *D. oschei* resultou numa maior sensibilidade de jovens ao DBP, em relação a *L. marina*, podendo ter ocasionado má formação no estágio embrionário.

Em relação à dose-resposta do DBP com ambas as espécies, as populações apresentaram uma oscilação não monotônica das taxas de Oviposição durante o período experimental. É importante enfatizar que alguns desreguladores endócrinos apresentam características não-monotônicas (VANDENBERG, 2014), o que realmente foi visto para o parâmetro de Oviposição diária. Contudo, muitos autores negligenciam que o efeito de desreguladores endócrinos pode estar ligado com fatores abióticos e podem apresentar uma alta relevância na modificação dos resultados (HAYES *et al.*, 2002; HAYES, 2005; HAYES *et al.*, 2006).

L. marina e *D. oschei* são espécies que possuem ciclos de vida diferentes, sendo em torno de três e 14 dias, respectivamente, tendo a disponibilidade alimentar igual a que testamos aqui com cepas de bactérias mortas com concentração de 3×10^9 células / ml (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Porém os tempos de desenvolvimento dos estágios de vida desses nematóides podem ser alterados pela poluição. No presente estudo foi identificado que os tempos de desenvolvimento de ambos os nematóides foram afetados pelo DBP. Na presente investigação *L. marina* chegou à fase adulta, no controle, em torno de 4,9 dias, um resultado semelhante com o de (LIRA *et al.*, 2011) que investigou os tempos de desenvolvimento desse nematoide sobre exposições de metais pesados, onde *L. marina* teve o seu tempo de desenvolvimento no controle de 5 e 4,5 dias para bário e cádmio, respectivamente. MOENS & VINCX (2000) evidenciaram que *L. marina* teve um crescimento mais lento em temperaturas mais baixas, como a testada aqui (18° C). Já *D. oschei* maturou mais lentamente chegando à fase adulta em torno de 21 dias e o mesmo ocorreu com outra espécie do mesmo gênero *Diplolaimelloides* quanto testado em baixas temperaturas (MOENS AND VINCX, 2000).

O tempo de eclosão de ovos de *L. marina* não pode ser calculado devido à alta taxa de viviparidade que a espécie demonstrou. Porém, pelo tempo que a espécie chegou à fase adulta e pelo tempo larval que a espécie apresentou, pode-se concluir que em todos os tratamentos, os ovos depositados eclodiram em menos de um dia. Já em *D. oschei* teve um aumento significativo no tempo de eclosão de ovos nas quatro maiores concentrações (2; 4; 8 e $16 \mu\text{g mL}^{-1}$), as mesmas concentrações que

causaram diminuição de ovos depositados. Os primeiros ovos puderam ser observados logo no primeiro dia de contagem, porém os primeiros juvenis só apareçam seis dias após em todas as concentrações, o que corrobora com os resultados de MOENS & VINCX (2000), que uma mesma faixa de gradiente de temperatura testada aqui, o aparecimento dos primeiros jovens ocorreu entre 6 e 7 dias. Estatisticamente o tempo de desenvolvimento pós-embrionário diferiu das concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 16, porém houve dispersão das amostras, o que diminui a confiabilidade desse resultado. Observando de forma ecológica, é possível notar que apenas as maiores concentrações tiveram uma diferença de resultado. Comparado ao controle, as maiores concentrações apresentaram de dois a quatro dias a menos de diferença no tempo em que nasceram as larvas até se tornarem adultas e isso pode ser uma estratégia para reduzir os gastos de metabolismo usados para atingir a maturidade sexual (SCHIEMER *et al.*, 1980). A difícil comparação com outros grupos de invertebrados é num tanto desanimador, pois a análise de tempo de desenvolvimento de invertebrados é uma ferramenta bem simples que pode abranger diversas áreas de pesquisa. Não foram encontrados estudos com nenhum dos ésteres de ftalatos que relacionassem as exposições com os tempos de desenvolvimento de invertebrados.

Dos sete parâmetros aqui analisados, seis puderam ser calculados para ambas as espécies, tendo em vista que o Tempo de eclosão de ovos não pode ser calculado para *L. marina*. Dos seis parâmetros, todos os parâmetros apresentaram resultados significantes para *L. marina*, porém para *D. oschei* a população de adultos não foi significativa. No entanto as diferentes estratégias de vida desses nematoides mostraram que ambos foram sensíveis ao DBP, porém sendo atingidos de formas distintas por contaminantes. Vale salientar que a toxicidade do DBP foi diferente para ambas as espécies e não foram observados maior sensibilidade de uma espécie em relação a outra no geral. Para se chegar a essa conclusão foi necessário observar parâmetro por parâmetro minuciosamente, uma vez que, as espécies, em sua maioria, apresentaram respostas diferentes à exposição do DBP.

3.5 CONCLUSÃO

Tanto *Litoditis marina* quanto *Diplolaimelloides oschei*, mostraram ser excelentes biomodelos para experimentos *ex situ* com ênfase ecotoxicológica. Esses resultados contribuem para que ambas as espécies tornem-se modelos de referência para pesquisas posteriores. Ambas as espécies foram semi-tolerantes a concentrações agudas do DBP, pois não apresentaram mortalidade de 100% mesmo sendo testados em concentrações que ainda não foram reportadas dentro do ambiente marinho e estuarino. Porém concentrações frequentemente encontradas no meio ambiente modificaram parâmetros importantes em ambas às espécies, como suas taxas reprodutivas e tempos de desenvolvimento. *Litoditis marina* mostrou maior tolerância ao DBP, em relação a *D. oschei*, no parâmetro de tempo de maturação. Já *D. oschei* maior tolerância ao DBP na população de adultos. Em *L. marina* o DBP mostrou ter uma resposta não-monotônica na oviposição. Já em *D. oschei* o DBP apresentou possivelmente o efeito Hormese no crescimento populacional já que pequenas concentrações estimularam o crescimento. Ainda há uma grande lacuna de conhecimento a cerca dos ésteres de ftalatos e seus impactos em populações e comunidades marinhas e estuarinas. São mais de 40 aditivos que ainda são frequentemente utilizados desenfreadamente e, na América do sul, ainda não há legislações que proíbam ou restrinjam o uso desses contaminantes. Para isso é necessário estudos com espécies tropicais para contribuir com uma legislação local mais rígida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Artur Maia pela disponibilidade de ajudar a adquirir os compostos de ftalatos. Ao professor Paulo Sérgio Martins de Carvalho por todas as dúvidas retiradas. À “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco- FACEPE” e CAPES pelo suporte financeiro e a todas as pessoas que tornaram este artigo possível.

4 MANUSCRITO II

Desenvolvimento do nematóide de vida-livre *Litoditis marina* (Bastian, 1865) Sudhaus na presença do nematoide *Diplolaimelloides oschei* (Meyl, 1974), associado a efeitos da poluição por Dibutil ftalato e estresse térmico.

Resumo

O dibutil ftalato (DBP) é um importante aditivo na indústria cosmética que se torna disponível no sedimento marinho/estuarino quando materiais que o contém são descartados de forma inadequada podendo comprometer a funcionalidade de organismos marinhos. Além do mais, mudanças climáticas podem potencializar o efeito desses aditivos. Visto essas informações, o objetivo da presente pesquisa é através dos nematoides estuarinos *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei*, testar o efeito do DBP isoladamente e com a variável de temperatura sobre parâmetros populacionais quando esses estão em interação. Foram realizados dois experimentos, ambos em microcosmo. O primeiro experimento, para efeito isolado do DBP na interação utilizando diferentes concentrações do DBP. O segundo, utilizou o tratamento de 2 µg mL⁻¹ de DBP em diferentes temperaturas (18, 22, 26 e 30° C). Não foi observado crescimento populacional de *D. oschei*, porém a poluição diminuiu populações de *L. marina*, corroborando com a hipótese de que o efeito do DBP é potencializado pelo aumento da temperatura.

Palavras-Chave: Relações ecológicas; Ecotoxicologia; Ésteres de Ftalato; Nematoda; Temperatura.

Abstract

Dibutyl phthalate (DBP) is an important additive in the cosmetic industry that becomes available in the marine/estuarine sediment when materials containing it are improperly disposed of and may compromise the functionality of marine organisms. Moreover, climate change can potentiate the effect of these additives. Based on this information, the aim of the present study is to study the effect of DBP alone and with the temperature variable on population and embryonic parameters when interacting with the estuarine nematodes *Litoditis marina* and *Diplolaimelloides oschei*. Two experiments were performed, both in microcosm. The first experiment, for isolated effect of DBP in the interaction used different concentrations of DBP. The second one used the treatment of 2 µg mL⁻¹ DBP at different

temperatures (18, 22, 26 and 30° C). It was not observed a population growth of *D. oschei*, but the pollution decreased populations of *L. marina* drastically and corroborating with the hypothesis that the effect of the DBP is potentiated by the increase of the temperature.

Keywords: Ecological relationships; Ecotoxicology; Phthalate esters; Nematoda; Temperature.

4.1 INTRODUÇÃO

A meiofauna é composta por um grupo de animais que passam em peneiras de malha de 1,0 mm, porém retidos em peneiras de malha de até 0,45 mm (KENNEDY & JACOBY, 1999) e o filo Nematoda está em maior abundância na maioria dos substratos habitados pela meiofauna (RAES & VANREUSEL, 2006). Os nematoides de vida-livre são animais vermiformes, de diferentes hábitos alimentares, que podem desempenhar funções importantes no sedimento marinho, como transferência e decomposição de matéria orgânica (FRECKMAN, 1988; NEHER, 2001), fixação de nitrogênio (PETERSEN *et al.*, 2017) entre outros. Além do mais são frequentemente utilizados em estudos experimentais (DE MEESTER *et al.*, 2015a; INGELS *et al.*, 2018) e voltados para ecotoxicologia (LIRA *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2018).

Litoditis marina e *Diplolaimelloides oschei* são duas espécies de nematoides bacterívoros, que coexistem no mesmo ambiente, sendo encontradas em depósitos de algas marinhas (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Ambas as espécies estão sendo cada vez mais utilizadas em estudos experimentais e já foi documentada a competição dessas espécies com diferentes concentrações de alimentos (DOS SANTOS *et al.*, 2009), onde *L. marina* foi o melhor competidor em altas concentrações de alimento. Ambos os nematóides são considerados oportunistas e dependem da densidade de alimento para estabelecer suas populações, porém apresentam diferentes níveis na escala colonizador-persistente proposta por BONGERS (1990). *L. marina* é considerado um nematoide extremo colonizador de Cp-1 e *D. oschei* um nematoide colonizador de Cp-2 (BONGERS & BONGERS, 1998; DOS SANTOS *et al.*, 2008). *Litoditis marina* é considerado também um oportunista de enriquecimento, ou seja, depende de alta disponibilidade de alimento para ter crescimento populacional e ainda é muito tolerante a variações do meio ambiente. Porém a presença de

contaminantes químicos no meio ambiente pode diminuir seu tempo de vida e abundância na população (LIRA *et al.*, 2011).

Um contaminante que vem sendo cada vez mais estudado é o Dibutil ftalato ou D-n- butil ftalato (DBP). É um importante aditivo em materiais plásticos que serve para modificar as propriedades físicas, tornando-os mais duradouros e maleáveis. No entanto, como o DBP não faz parte da natureza química de um material plástico, acaba se despreendendo com facilidade desse material e se torna disponível no meio ambiente (LIANG *et al.*, 2008). Seu uso desenfreado faz com que o DBP seja um ftalato frequentemente encontrado em corpos d'água de diversas regiões do mundo (ZHANG *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2018b), tendo variações de concentração em água doce e marinha de 0,12 a 8,8 mg mL⁻¹ e em sedimentos de 0,06 a 20,8 mg kg⁻¹, além do mais, as condições ambientais adversas fazem com que o DBP seja mais precipitado e adsorvido no sedimento. XU & LI (2008) descobriram que quando maior a salinidade do ambiente, maior será adsorção do DBP no sedimento marinho, e isso pode prejudicar animais que vivem nesse meio. Outro fator abiótico também de importância é a temperatura, uma vez que o planeta enfrenta processos de aquecimento (VITOUSEK, 1994; CHANGE, 2014) e este por si já tem um grande efeito na estabilidade ecossistêmica. Porém pouco se sabe se a temperatura é um fator que pode aumentar a toxicidade do DBP.

No quinto relatório de avaliação do Painel Intergovernamental sobre mudanças climáticas estimou-se que o planeta aquecerá em torno de 5° C até 2100 (COLLINS *et al.*, 2013), caso o planeta não pare com as emissões exacerbadas de CO₂. Caso isso ocorra provocará um aumento significativo, maior que o habitual, na temperatura dos oceanos, o que pode causar maior liberação do DBP no ambiente marinho e acarretar em maior adsorção do DBP na água e no sedimento afetando animais que vivem nesses meios e conseqüentemente o equilíbrio local. É sabido que a temperatura isolada desencadeia diversos processos metabólicos que prejudicam a vida de vários invertebrados (NEWELL & BRANCH, 1980). Porém pouco se conhece ainda como o DBP pode afetar organismos que vivem no sedimento marinho a nível populacional e ainda mais quando se há o aumento da temperatura.

Por consequência dessas informações foram elaboradas as seguintes hipóteses: (1) O aumento da concentração por DBP e a presença do nematoide *Diplolaimelloides oschei* impedirá *L. marina* de aumentar suas populações, pois além do aumento da toxicidade do DBP, poderá ocorrer uma interação ecológica negativa (i.e:

competição) por alimento entre as duas espécies e isso acarretará em um efeito negativo sobre as populações de *L. marina*. (2) O aumento da temperatura potencializará o efeito da primeira hipótese, já que as modificações de temperatura são estressores que por si só já acarretaram efeitos negativos nas populações de *L. marina* (DE MEESTER et al., 2015a; DE MEESTER et al., 2015b).

Mesmo que o DBP seja um contaminante comumente encontrado em águas e sedimentos marinhos, ainda é despercebido por muitos ecotoxicologistas. Ainda hoje não é compreendido como esse poluente pode afetar populações de vários invertebrados marinhos e em especial de nematoides. Por este motivo, através de experimentos *Ex situ*, esta pesquisa tem como objetivo compreender mudanças no comportamento populacional de *L. marina* na presença de *Diplolaimelloides oschei*, avaliando os efeitos do DBP e mudanças de temperatura.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Escolha e cultivo dos biomodelos

Ambas as espécies aqui estudadas, *Litoditis marina* (Bastian, 1865) Sudhaus, 2011 e *Diplolaimelloides oschei* (Meyl, 1954), são espécies que tendem a serem num futuro bem breve, excelentes biomodelos. São facilmente cultivadas, tem curto tempo de vida, são sensíveis a variações ambientais, além de gerarem grande número de prole. São encontradas em depósitos de algas marinhas (DERYCKE et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2008; DE MEESTER et al., 2015a; DERYCKE et al., 2016) e ambas se alimentam de bactérias. São espécies originadas do Estuário de Westerschelde, no sudeste da Holanda e cultivadas no Brasil, no Laboratório de Cultivo de Invertebrados da Meiofauna Marinha e Estuarina, em Recife-PE. As espécies são mantidas em culturas monoespecíficas com temperatura (18°C) e salinidade (25) constante. *Litoditis marina* é uma espécie que apresenta melhor estabilidade populacional em ágar mais concentrados, contrariando *D. oschei*. Por este motivo testes prévios foram realizados nas culturas com diferentes concentrações de ágar e a concentração de 0,9 % foi a que manteve ambas as populações em crescimento exponencial.

A motivação de escolher ambas as espécies é que além de coexistirem no mesmo ambiente, já foram utilizadas em estudos experimentais (também em nível de gênero) e tiveram boas respostas para as indagações em curto prazo, além de serem organismos de fácil manuseio e baixo custo de manutenção (VRANKEN *et al.*, 1991; DERYCKE *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2009; LIRA *et al.*, 2011; DE MEESTER *et al.*, 2015a). *Litoditis marina* é uma espécie críptica, que chega a fase adulta em três dias, além de fazer parte de um complexo de mais de 10 espécies, onde já foram reportadas diferenças ecológicas entre elas (DE MEESTER *et al.*, 2012; DERYCKE *et al.*, 2016). Neste estudo foi escolhida a espécie Pm III pois já foi reportado que a mesma suporta temperaturas mais quentes e variações da mesma (DE MEESTER *et al.*, 2015a). *Diplolaimelloides oschei* tem o ciclo de vida relativamente maior que *L. marina* e chega à fase adulta em torno de 14 dias. Por ser uma espécie de Cp-2 pode mostrar-se resiliente a grandes impactos ambientais chegando a restabelecer suas populações após longos períodos de tempo (SOTO *et al.*, 2017).

4.2.2 Ftalato e solventes

O Dibutil ftalato (DBP) foi fabricado pela Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) com 99% de pureza. A acetona PA foi utilizada como solvente neste trabalho. Um experimento piloto com acetona demonstrou que a acetona não afeta as populações de nematoides significativamente, no entanto, a alta volatilidade da acetona, deixava a formação de cristais do DBP no ágar, então para melhor solubilidade do ftalato no ágar, foi necessária a adição de um surfactante Polisorbato 80 ou Tween 80, que também não se mostrou tóxico em experimentos pilotos.

4.2.3 Preparação das concentrações do Dibutil ftalato

As concentrações do DBP foram feitas através de soluções estoque. O DBP foi diluído com uma solução de acetona e Tween 80 juntos, que foi preparada com a mesma concentração para todos os tratamentos. A solução estoque inicial continha nove ml de acetona com 700 µl de tween 80. Essa solução serviu para solubilizar o DBP e determinar as concentrações no ágar utilizado no experimento. Para a realização do teste de interação de *L. marina* + *D. oschei* foram utilizadas as concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 µg mL⁻¹. Para o

teste de interação mais o estressor de temperatura, foi utilizada apenas a concentração de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O gradiente de concentração foi baseado em estudos de análise de concentrações do DBP em água e sedimento (GAO & WEN, 2016). Porém, como não se pode calcular a concentração de efeito não observado (CENO) do DBP, a concentração de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi escolhida com base no capítulo I (obs. pessoais) e literatura anteriormente citada.

4.2.4 Preparação dos bioensaios

Todos os experimentos foram realizados em placas de Petri de seis cm^3 , descartáveis e esterilizadas. Também foram testados com dois controles experimentais, o controle biológico (sem solventes e/ou DBP) e o controle do solvente. O ágar foi preparado na concentração de 0,9 %, ou seja, adicionou-se 9 g de bactó-agar em 1 L de água do mar com salinidade 25. O ágar foi homogeneizado e esterilizado, com a posterior adição de 100 $\mu\text{L/L}$ de colesterol, pois nematoides não conseguem sintetizar esteroides quando sua única fonte de alimento é bactéria (VANFLETEREN, 1980). Para conduzir o experimento, as soluções com DBP foram homogeneizadas no ágar para volume final de 5 mL nas placas de Petri, com bastante cautela. Para montagem de testes sub-letais do DBP de *L. marina* + *D. oschei* (Teste 1), após o ágar ser adicionado na placa de Petri e enrijecido, uma gota de água do mar era aplicada no ágar, onde foram colocados seis machos e seis fêmeas de *L. marina* + seis machos e seis fêmeas de *D. oschei*. Os nematoides foram alimentados com 50 μL de cepas de *Escherichia coli* a 3×10^{-9} células mL^{-1} e a cada 10 dias, eram alimentados novamente. As placas foram vedadas e armazenadas em incubadoras a 18 °C, no escuro. Todos os tratamentos foram triplicados. As contagens de ovos, jovens e adultos (discriminando machos e fêmeas) foram feitas a cada 48 horas durante 20 dias e a cada 96 h até o 28° dia. Para os testes sub-letais do DBP de *L. marina* + *D. oschei* + estressor de temperatura (Teste 2), a montagem ocorreu da mesma forma, diferenciando apenas os tratamentos de temperatura, que foram 18 °C (Utilizada como temperatura controle); 22 °C; 26 °C e 30 °C e realizados em diferentes incubadoras no escuro. Todos os tratamentos tiveram o controle biológico (Controle 1), controle solvente (Controle 2) + tratamento com 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DBP em triplicatas. Os nematoides também foram alimentados com 50 μL de cepas de *Escherichia coli* K12 morta com concentração de 3×10^{-9} células mL^{-1} no dia da montagem e a cada 10 dias. A cada 48 h durante 10 dias eram feitas as contagens de ovos, jovens, machos e fêmeas de ambas as espécies, após esse período as contagens eram feitas a cada 96h até o 28° dia.

Após o término dos experimentos, foram calculados os parâmetros de População total, População de jovens e adultos, Oviposição diária de *L. marina* (DOS SANTOS *et al.*, 2009).

4.2.5 Cálculo dos parâmetros

Todos os dados foram transferidos para uma planilha eletrônica e através dele foram calculados os parâmetros populacionais de ambos os testes. A população de adultos foi calculada pelo somatório da população de machos + população de fêmeas. A população total foi calculada pelo somatório da população de jovens + adultos. Para análise estatística de crescimento de população total (Adultos + Jovens), de adultos e de jovens de *L. marina* foram utilizados os dados da Área sob a curva (ASC) (HANLEY & MCNEIL, 1982). A Oviposição diária de *L. marina* foi calculada através da média de ovos depositados / dias contados para *L. marina* e para *D. oshei* foi calculada a média total de ovos depositados durante todo o experimento.

4.2.6 Análise de dados

Todos os parâmetros foram analisados através do software PRIMER v6 pelo teste não-paramétrico de Análise de Variância multivariada Permutacional (PERMANOVA), por não atenderem as premissas de variância paramétrica. Os dados foram primeiramente transformados em raiz (4) para padronização de dados e depois construída a matriz de similaridade baseados em distância Euclidiana com 9999 permutações. A diferença significativa entre as amostras foi assumida com 95% de confiança, posteriormente tratadas pelo PERMDISP para testar se a homogeneidade das dispersões foi definida pelos fatores ou pelos tratamentos. Quando definidas pelos fatores, análise de Escalonamento multidimensional (MDS) foi rodada para identificar a distância entre fatores e tratamentos. Quando definida pelos tratamentos, os dados que assumiam $p < 0,05$ e número de permutações inferior a 150, foram submetidos ao teste Monte Carlo para discriminar a diferença entre os tratamentos (ALVES *et al.*, 2013). Os gráficos foram plotados pelo programa Sigmaplot V.12.5.

Quadro 2 - Cálculo e forma de análise de todos os parâmetros analisados no presente estudo para as espécies *Litoditis marina* (ASC) = Área abaixo da curva.

Parâmetros		Cálculo	Análise
Parâmetros populacionais	População Total	ASC de Adultos + ASC de jovens	Estimativa da quantidade de nematoides por placa
	População de nematoides jovens	ASC de jovens	Estimativa da quantidade de nematoides jovens por placa
	População de Nematoides adultos	ASC de adultos	Estimativa da quantidade de nematoides adultos por placa
	Oviposição diária	Média das réplicas do número de ovos/ Total de dias contados	Número de ovos depositados por dia

4.3 RESULTADOS

4.3.1 População de *Litoditis marina* na presença de *Diplolaimelloides oschei* (Teste 1)

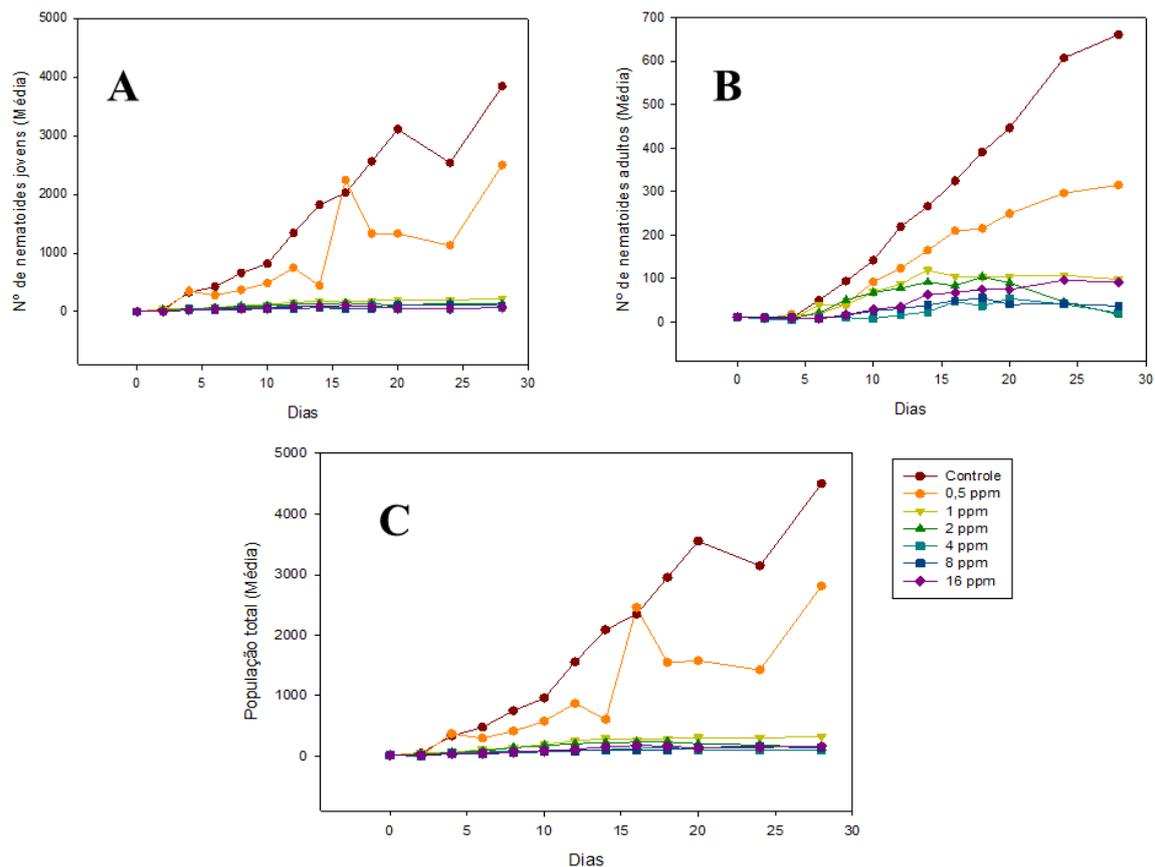
Para este teste, não houve diferença significativa entre o controle biológico e o controle do solvente (PERMANOVA, Valor de $p > 0,05$), por isso, todos os tratamentos foram comparados apenas com o controle do solvente tendo em vista que só foi comparado o efeito do DBP.

4.3.1.1 *Litoditis marina*

A população total (Figura 14) foi significativamente diferente entre os tratamentos (Pseudo-F = 453,48 e $p = 0,001$) e diferença entre os tratamentos não foi causada por dispersão (PERMDISP, Valor de $p = 0,3$). Todas as concentrações diferiram do controle (PERMANOVA, valor de $p < 0,05$) podendo ser observadas diferenças no tamanho populacional entre os tratamentos. A menor concentração de DBP ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou uma redução drástica no tamanho populacional. Em todas as concentrações, o tamanho

populacional foi menor do que a do controle, sendo observado que as menores populações se encontravam nas três concentrações mais altas (4; 8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 14- Média das réplicas da População de jovens (A), de adultos (B) e População total (C) de *Litoditis marina* em cada tratamento (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) ao longo do tempo (em dias). Os eixos Y dos painéis em cada gráfico variam para melhor visualização dos resultados.



Fonte: Autor.

A população de nematoides jovens (Figura 14) foi estatisticamente significativa entre os tratamentos (Pseudo-F = 463,8 e $p = 0,001$) e a diferença entre os tratamentos não foi causada por dispersão (PERMDISP, Valor de $p = 0,36$). Todas as concentrações diferiram do controle (PERMANOVA, valor de $p < 0,05$). Os primeiros jovens puderam ser observados já no primeiro dia de contagem no controle e nas concentrações de 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já no segundo dia de contagem, todos os tratamentos apresentavam nematoides jovens, podendo ser observada a discrepância entre o controle e o resto dos tratamentos.

A população de adultos foi estatisticamente significativa entre os tratamentos (Pseudo-F = 131,07 e $p = 0,0001$). Os dados não apresentaram dispersão

(PERMDISP, Valor de $p = 0,29$). Todas as concentrações diferiram do controle (PERMANOVA, valor de $p < 0,05$). Os primeiros adultos apareceram no segundo dia de contagem apenas na menor concentração ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). No terceiro dia de contagem apenas as duas maiores concentrações ainda não apresentavam adultos. No quarto dia de contagem, todos os tratamentos já tinham adultos.

A Oviposição diária (Tabela 4) foi estatisticamente diferente entre os tratamentos (Pseudo-F = 346,97 e $p = 0,0001$). Os dados não apresentaram dispersão (PERMDISP, Valor de $p = 0,91$). Todas as concentrações diferiram do controle (PERMANOVA, valor de $p < 0,05$), diminuindo a taxa de oviposição. No primeiro dia de contagem, as três concentrações mais baixas, já tinham ovos depositados. No segundo dia de contagem, todos os tratamentos tinham ovos depositados. Porém, *L. marina* em condições de estresse pode apresentar os dois tipos de estratégia de reprodução, vivípara e ovípara. Neste experimento ela apresentou as duas condições. Isso sendo notado pelo número de jovens ser muito maior de que o número de ovos depositados. O controle teve o maior número de ovos depositados, seguindo da concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após isso *L. marina* apresentou uma maior taxa de viviparidade, nas concentrações acima de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo observados poucos ovos durante todo o período de contagem.

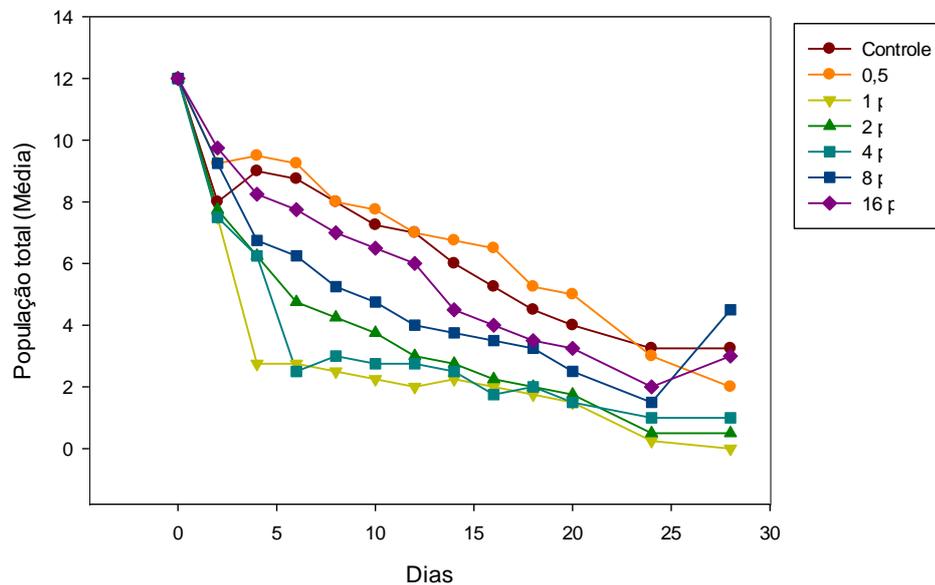
Tabela 4 - Média e Erro Padrão da Oviposição diária de *Litoditis marina* em diferentes tratamentos do DBP. (*) refere-se aos parâmetros que diferiram estatisticamente do controle.

Média ± Erro Padrão	
Tratamento	Oviposição diária
Controle	76,5 ± 4,1
0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	55,83 ± 3,34*
1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	6,96 ± 0,51*
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	4,04 ± 0,12*
4 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,96 ± 0,25*
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,17 ± 0,24*
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,5 ± 0,31*

4.3.1.2 *Diplolaimelloides oschei*

Não houve crescimento populacional de *D. oschei* em nenhum dos tratamentos, até o penúltimo dia de contagem (Figura 15). Os primeiros jovens começaram a aparecer no último dia de contagem nas maiores concentrações (8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) onde houve declínio populacional de *L. marina*. Além do mais, não houve mortalidade de 100% dos indivíduos de *D. oschei* até o 22º dia de experimento, o que permitiu a continuação do mesmo.

Figura 15 - População total de *D. oschei* ao longo do tempo em diferentes concentrações de DBP (em $\mu\text{g mL}^{-1}$).



Fonte: Autor.

4.3.2 População de *Litoditis marina* na presença de *Diplolaimelloides oschei* + estressor de temperatura (Teste 2)

4.3.2.1 *Litoditis marina*

4.3.2.1.1 Controles

Neste experimento foram observados que o controle biológico e o controle do solvente tiveram diferenças estatísticas entre os parâmetros de População total, População de jovens e Oviposição. As diferenças serão mostradas na tabela a seguir (Tabela 5). Mesmo *L. marina* tendo demonstrado sensibilidade aos tratamentos de 26° C e 30° C entre

os controles, iremos comparar os efeitos do DBP apenas com o controle do solvente, comparando se o DBP potencializou o efeito do solvente nesses tratamentos.

Tabela 5 – Média das réplicas do número de indivíduos de *L. marina* calculada pela Área sob a curva (ASC) dos Parâmetros populacionais nos diferentes tratamentos de temperatura dos controles. Controle 1 (Controle Biológico), Controle 2 (Controle do Solvente). Todos os tratamentos de temperatura foram analisados individualmente. Em vermelho são destacados os tratamentos em que os controles tiveram diferenças entre si, com seu respectivo valor de p.

Poluição por DBP (2 µg mL ⁻¹)				
Tratamentos	População Total (ASC)	População Jovem (ASC)	População de adultos (ASC)	Oviposição diária
(Controle 1) 18°C	27020	23593,67	3438,34	227,34
(Controle 2) 18°C	23373,67	17750,67	5635	170,67
(Controle 1) 22°C	30001,34	23495,67	6517,67	538,34
(Controle 2) 22°C	31168,34	22400	8780,34	490,67
(Controle 1) 26°C	29832	20583,34	6260,67	429,67
(Controle 2) 26°C	11082,34 (p = 0,0001)	8189,34 (p = 0,0001)	2905	244,67 (p = 0,03)
(Controle 1) 30°C	15809	11832,34	3988,67	335,334
(Controle 2) 30°C	13852	10358,34	3374,34	10 (p = 0,0005)

4.3.2.1.2 Temperatura isolada

Primeiro foram analisados os controles biológicos (Controle 1) de *L. marina* com a presença de *D. oschei* para saber se houve efeito da temperatura em si.

Consideramos a temperatura de 18° C como a temperatura controle, já que os nematoides eram condicionados rotineiramente a essa temperatura. Neste experimento também não houve crescimento populacional de *D. oschei*, apenas foi observado o nascimento de alguns jovens nos últimos dias de contagem.

Para População Total de *L. marina* os tratamentos diferiram estatisticamente do controle (Pseudo-F= 89,79 e P= 0,003). Não houve dispersão entre as amostras PERMDISP, Valor de p = 0,21). A análise entre pares do PERMANOVA identificou diferenças entre os tratamentos de 18° C e 30°C (valor de p= 0,0008), havendo uma diminuição significativa do crescimento populacional. As temperaturas de 22° e 26° C também diferiram do tratamento de 30° C (valor de p < 0,05) sendo elas com tamanhos populacionais maiores que a temperatura de 18° C usada como controle (Tabela 5).

As populações de Jovens de *L. marina* também diferiram estatisticamente do controle (Pseudo-F= 163,66 e P= 0,007) e não houve dispersão entre as amostras (PERMDISP, Valor de p = 0,22). As temperaturas de 26°C e 30°C populações menores que o controle e diferiram significativamente do mesmo (PERMANOVA, valor de p < 0,05). Os tratamentos de 22° e 26° C diferiram entre si e ambos diferiram do tratamento de 30° (PERMANOVA, valor de p < 0,05), pois este último apresentou uma menor população.

As populações de adultos não diferiram estatisticamente entre nenhum dos tratamentos (Pseudo-F= 163,66 e P > 0,05).

A Oviposição diária (Tabela 6) mostrou diferença significativa entre os tratamentos (Pseudo-F= 8,76 e P= 0,0007) e não houve dispersão entre as amostras (PERMDISP, Valor de p = 0,87). As temperaturas de 22° e 26° diferiram do controle da temperatura (PERMANOVA, valor de p < 0,05) apresentando maiores taxas de oviposição.

Tabela 6 - Média e Erro Padrão da Oviposição diária de *Litoditis marina* em diferentes tratamentos de temperatura. Os resultados são dados do controle sem solvente e sem contaminação por DBP. (*) refere-se aos parâmetros que diferiram estatisticamente do controle de temperatura (18° C).

Média ± Erro Padrão	
Tratamento	Oviposição diária
18° C	227,3 ± 30,63
22° C	538,3 ± 38,51*
26° C	429,6 ± 43,45*
30° C	335,3 ± 46,91

4.3.2.2 Poluição por DBP

Os tratamentos com 2 µg mL⁻¹ de DBP foram comparados apenas com os seus respectivos controles na mesma temperatura para o conhecimento do efeito isolado do DBP em *L. marina*.

Para População Total, todos os tratamentos com 2 µg mL⁻¹ de DBP diferiram dos seus controles (Valor de p < 0,05). Em todos os tratamentos com DBP as populações foram significativamente menores que seus respectivos controles (Tabela 7).

Para populações de Jovens, os tratamentos de 18° C, 22° C e 30° C diferiram do controle. Em todos os tratamentos houve diminuição do tamanho populacional, incluindo o tratamento de 26° C, porém, não foi estatisticamente significativa (Valor de p > 0,05).

Na População de adultos, o único tratamento que não diferiu de seu controle também foi de 26° C (Valor de p > 0,05), pois não houve uma diferença significativa entre os tamanhos populacionais do controle 26° C com o tratamento de DBP a 26° C.

Em Oviposição diária (Tabela 7), apenas o tratamento de 22° C diferiu do seu respectivo controle (P = 0,01), mostrando uma diminuição significativa de ovos depositados.

Tabela 7 – Parâmetros populacionais de *Litoditis marina* em $2\mu\text{g mL}^{-1}$ de DBP para diferentes tratamentos de temperatura. Em vermelho estão destacados os tratamentos que diferiram estatisticamente de seu controle. (*) ASC = Área sob a curva.

Tratamentos	População Total (ASC*)	População Jovem (ASC)	População de adultos (ASC)	Oviposição diária
Controle 18°C	23373,67	17750,67	5635	170,67
X	15609	12952,34	2668,67	183,67
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 18°C	(p = 0,0008)	(p = 0,002)	(p = 0,0005)	
Controle 22°C	31168,34	22400	8780,34	490,67
X	20002,67	15854	4160,67	252
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 22°C	(p = 0,001)	(p = 0,0008)	(p = 0,002)	(p = 0,01)
Controle 26°C	11082,34	8189,34	2905	244,67
X	9332,34	7607,67	1736,67	268
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 26°C	(p = 0,002)			
Controle 30°C	13852	10358,34	3374,34	10
X	3417,67	2667	762,67	51,67
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 30°C	(p = 0,0006)	(p = 0,001)	(p = 0,002)	

4.3.2.2.1 Poluição por DBP x Temperatura

Foram analisados os tratamentos com $2\mu\text{g mL}^{-1}$ de DPB em função da temperatura para verificar se a poluição por DBP potencializa o efeito da temperatura e vice-versa.

O parâmetro de População Total de *L. marina* foi estatisticamente significativo entre os tratamentos (Pseudo-F= 144,97 e P= 0,0001). Não houve dispersão entre as amostras (PERMDISP, Valor de p = 0,31). A análise entre pares identificou diferenças significativas entre todos os tratamentos (Valor de p < 0,05). Na tabela 8 podemos observar

um aumento significativo da população na temperatura de 22° C. Porém a população cai com o aumento da temperatura.

Tabela 8 – Média das réplicas de todos os parâmetros populacionais e embrionários de *L. marina*. Os parâmetros foram comparados par a par e em vermelho estão destacados aqueles que apresentaram diferença estatística. As temperaturas são representadas por letras (a, b, c e d) e mostradas quando há diferença estatística entre elas.

Poluição por DBP (2 µg mL⁻¹) X Temperatura					
Tratamentos	População Total (ASC)	População Jovem (ASC)	População de adultos (ASC)	Oviposição diária	Proporção sexual
DBP a 18°C (a)	15609 (b, c, d)	12952,34 (b, c, d)	2668,67 (b, c, d)	183,67 (c, d)	1,12
DBP a 22°C (b)	20002,67 (a, c, d)	15854 (a, c, d)	4160,67 (a, c, d)	252 (d)	1,06
DBP a 26°C (c)	9332,34 (a, b, d)	7607,67 (a, b, d)	1736,67 (a, b, d)	268 (a, d)	1,12
DBP a 30°C (d)	3417,67 (a, b, c)	2667 (a, b, c)	762,67 (a, b, c)	51,67 (a, b, c, d)	1,02

As populações de jovens diferiram estatisticamente dos tratamentos (Pseudo-F= 113, 39 e P= 0,0001) e as diferenças não foram causadas por dispersão das amostras (PERMDISP, Valor de p = 0,45). A análise entre pares mostrou diferença significativa entre todos os tratamentos (Valor de p < 0,05).

A população de adultos também diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Pseudo-F= 46,78 e P= 0,0001) e não houve dispersão entre as amostras (PERMDISP, Valor de p = 0,36). Todos os tratamentos diferiram entre si (Valor de p < 0,05).

A Oviposição diária também foi estatisticamente afetada entre os tratamentos (Pseudo-F= 37,37 e P= 0,0001) e não houve dispersão entre as amostras (PERMDISP, Valor de p = 0,27). A análise entre pares foi estatisticamente diferente entre todos os tratamentos (Valor de p < 0,05). O aumento da temperatura fez com que os nematoides depositassem mais ovos, porém a maior temperatura (30° C) mostrou uma drástica queda em relação a esse valor.

4.4 DISCUSSÃO

Com base em hábitos alimentares, aqui foram escolhidos dois gêneros de nematóides que se alimentam exclusivamente de bactérias (VIERSTRAETE & VINCX, 1996) e podem estabelecer estratégias competitivas entre elas. Ambos os nematóides são

considerados oportunistas e dependem da densidade de alimento para estabelecer suas populações, porém apresentam diferentes níveis na escala colonizador-persistente, onde *L. marina* é considerado um extremo colonizador de Cp-1 e *D. oschei* um nematoide de Cp-2 (BONGERS & BONGERS, 1998; DOS SANTOS *et al.*, 2008). Além do mais, já se é conhecida a interação de ambas as espécies frente à disponibilidade de alimento, mostrando que *L. marina* tem um crescimento exacerbado em alta disponibilidade de alimento, igual a aqui testada (3×10^9 células mL⁻¹), enquanto que *D. oschei* tem crescimento reduzido (DOS SANTOS *et al.*, 2009).

No presente estudo foi observada uma forte interação de *L. marina* com *D. oschei* mesmo sem o efeito da poluição por DBP e/ou da temperatura. Os nossos controles experimentais mostraram que *D. oschei* não consegue incrementar suas populações nas condições experimentais aqui testadas quando há interação com *L. marina*. O não crescimento populacional de *D. oschei* nestes experimentos pode ser explicado por dois fatores. Quando DOS SANTOS *et al.* (2009) fizeram a interação com ambos os nematoides para avaliar a capacidade de crescimento populacional com níveis diferentes de alimentação, teve crescimento populacional reduzido e mostrou decréscimo a partir do 16º e caiu bruscamente até o último dia de contagem. Enquanto que as populações de *L. marina* cresceram exacerbadamente. Porém Santos e colaboradores utilizaram a espécie críptica PmI e nós utilizamos PmIII. Como DERYCKE *et al.* (2016) já puderam observar, há diferenças ecológicas entre espécies crípticas e isso pode ter sido um fator primordial, sendo PmIII um melhor colonizador do que PmI. O outro fator que pode ter dificultado o crescimento populacional de *D. oschei* na presença de *L. marina* é a concentração do ágar. Onde mesmo que *D. oschei* consiga incrementar suas populações em um ágar mais rígido (Resultados do Manuscrito 1), a presença de *L. marina* pode ter ocasionado uma maior dificuldade. E também há diferença entre Santos e colaboradores (2009) que utilizaram o ágar a 0,75% e nossos experimentos, pois o ágar utilizado aqui foi o de 0,9%.

Adiante, nossa primeira hipótese sugeria que o aumento da concentração de DBP diminuiria as populações de *L. marina* na presença de *D. oschei* e nossa hipótese foi corroborada. De fato a poluição por DBP causou diminuição do crescimento populacional de *L. marina* e também não foram observados incrementos nas populações de *D. oschei*. Um experimento semelhante pode ser observado no estudo de MARTINEZ *et al.* (2012), onde foram testadas as interações entre as espécies *Plectus parvus* e *Acrobeloides nanus* sob diferentes concentrações de Cádmio, onde *A. nanus* se beneficia da presença de *P.*

parvus, e *P. parvus* era prejudicado por *A. nanus*. Seus resultados concluíram que maiores concentrações do Cádmiu diminuíram ainda mais as populações de *P. parvus* facilitando o crescimento populacional de *A. nanus*, onde foi atribuída maior tolerância do cádmio para *A. nanus* e uma menor competição por alimento. Nossos resultados mostraram que o aumento da concentração de DBP mais a presença de um nematoide bacterívoro diminuíram as populações de *L. marina*.

Contudo é importante salientar que nos últimos dias de contagem do experimento 1, foi possível observar a aparição de alguns jovens de *D. oschei* nas maiores concentrações (8 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), onde houve decréscimo das populações de *L. marina*. Essa proporcionalidade já foi constatada por VIERSTRAETE & VINCX (1996), onde populações de Mohnysterídeos crescem quando há redução nas populações de *L. marina*. Entretanto, a quantidade de jovens de *D. oschei* foi relativamente baixa, logo isso implica em posteriores estudos com maiores tempos de duração. Além do mais, no experimento 2 também foi possível observar a aparição de jovens de *D. oschei* nos dois últimos dias de contagem nas temperaturas de 18° e 26° contaminados com 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DBP, onde nessas temperaturas houve decréscimo nas populações de *L. marina*. Logo há uma importante semelhança com os estudos de DOS SANTOS *et al.* (2009), onde na interação de *L. marina* e *D. oschei* ocorreu uma facilitação para *D. oschei* quando *L. marina* foi inibida por densidades medianas e baixas de alimento.

Para o experimento com influência da temperatura, nossa hipótese também foi corroborada. Foi constatado que o aumento da temperatura foi um potencializador do efeito da poluição por DBP. A temperatura de 22°C sem poluição por DBP foi a que melhor desenvolveu crescimento populacional de *Litoditis marina*, além de não modificar suas taxas reprodutivas. Por mais que tenha sido resistente com o aumento da temperatura, corroborando os experimentos de (DE MEESTER *et al.*, 2015a), mostrou sensibilidade com as temperaturas de 26° C e 30° C. Houve uma redução no tamanho populacional de *L. marina* no tratamento de 26° C, porém os resultados sugerem que isso tenha acontecido pela maior sensibilidade dos jovens chegarem á fase adulta. Já no tratamento de 30° C foi possível observar a presença de muitos nematoides jovens. A temperatura em si já é um fator limitante que pode reduzir a eficiência de energia de diversos organismos (SOKOLOVA & LANNIG, 2008) e mesmo *L. marina* sendo resistente a temperaturas mais elevadas não significa que o aumento da temperatura não possa alterar seus parâmetros populacionais.

Ainda assim, mesmo com a contaminação de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ do DBP, a temperatura de 22°C também foi a que melhor desenvolveu o crescimento populacional de *L. marina*. Porém teve redução significativa em comparações com tratamentos sem DBP e uma maior redução quando comparada a temperaturas mais altas. Vemos um resultado parecido com o copépoda *Tigriopus japonicus*, o qual foi exposto a dois biocidas, o Cobre e o Tributílo estanho. Ambos os biocidas tiveram sua toxicidade aumentada com o aumento da temperatura (KWOK & LEUNG, 2005). Outro estudo também observou o aumento da toxicidade de dois metais pesados, cobre e prata, e confirmou maior sensibilidade de embriões do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* com o aumento da temperatura (BOUKADIDA *et al.*, 2016).

Como já dito antes, o aumento da temperatura e a poluição são fatores que isoladamente tornam os organismos mais sensíveis. A junção do aumento da temperatura com poluentes aumentando a sensibilidade de organismos aquáticos é bem documentada (CAIRNS JR *et al.*, 1975; BAT *et al.*, 2000; NEGRI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017), porém ainda pouco se conhece como esses fatores podem afetar populações de nematoides de vida-livre e suas interações. Nossos resultados mostram que a união de ambos os fatores podem além de comprometer o organismo em si, comprometer suas interações com outros organismos. Já esperávamos que houvesse um decréscimo na população de *L. marina* na presença de *D. oschei* e na contaminação por DBP, assim como também era esperado que esta espécie fosse ainda mais prejudicada com o aumento da temperatura. Os resultados aqui apresentados corroboraram com as hipóteses. Além do mais, a presente pesquisa contribui para melhor entendimento das relações de organismos com contaminantes que estão frequentemente disponíveis no meio ambiente, porém ainda é um campo de pesquisa que carece de informações mais específicas que possam futuramente contribuir com a preservação dos sedimentos marinhos.

4.5 CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou que maiores concentrações de DBP diminuem o tamanho populacional de *L. marina* na presença de *D. oschei*. Como não foi observado crescimento populacional de *D. oschei*, concluímos que *L. marina* foi mais tolerante ao DBP, em relação a *D. oschei*. Além do mais, é possível concluir que com o aumento da temperatura, *L. marina* tornou-se mais sensível à poluição por DBP. Porém são necessários estudos mais específicos para analisar se o resultado deve-se ao DBP ter se tornado mais disponível. Contudo, nossos resultados indicam também, que é necessário um tempo de exposição maior dos experimentos para melhor entendimento da interação entre *L. marina* e *D. oschei*.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa teve suporte da “Fundação de Amparo á pesquisa de Pernambuco” (Facepe) e da “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (Capes). Os autores têm os mais sinceros agradecimentos a todos os colegas de laboratório de tornaram possível esta pesquisa e a todos os autores citados que melhoraram a qualidade deste trabalho.

5 REFERÊNCIAS

- ADAMS, William J et al. A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**. v. 14, n. 9, p. 1569-1574, 1995.
- ALVARENGA, Vitória Luísa Cunha; DE OLIVEIRA, Fábio Viana; REIS, Marly Alves. **Plástico. In: Congresso Interdisciplinar-ISSN: 2595-7732, 2017, 2017.**
- ALVES, Ana Sofia et al. Benthic meiofauna as indicator of ecological changes in estuarine ecosystems: the use of nematodes in ecological quality assessment. **Ecological indicators**. v. 24, p. 462-475, 2013.
- ARAÚJO, Maria Christina Barbosa; SILVA-CAVALCANTI, Jacqueline Santos. Dieta indigesta: milhares de animais marinhos estão consumindo plásticos. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**. v. 10, n. 5, p. 74-81, 2016.
- BAIRD, Robin W; HOOKER, Sascha K. Ingestion of plastic and unusual prey by a juvenile harbour porpoise. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 51, p. 172-178, 2000.
- BASTIAN, H Charlton. II. Monograph on the Anguillulidæ, or Free Nematoids, Marine, Land, and Freshwater; with Descriptions of 100 New Species. **Transactions of the Linnean Society of London**. v. 25, n. 2, p. 73-184, 1865.
- BAT, Levent et al. Effect of temperature on the toxicity of zinc, copper and lead to the freshwater amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758). **Turkish Journal of Zoology**. v. 24, n. 4, p. 409-416, 2000.
- BATISTA-LEITE, Luciana de Matos Andrade; COELHO, Petrônio Alves; DOS SANTOS CALADO, Tereza Cristina. Estrutura populacional e utilização de conchas pelo caranguejo Ermitão *Calcinus tibicen* (Herbst, 1791)(Crustacea, Decapoda, Diogenidae). **Tropical Oceanography**. v. 33, n. 2, 2005.
- BOERGER, Christiana M et al. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. **Marine pollution bulletin**. v. 60, n. 12, p. 2275-2278, 2010.
- BONGERS, Tom. The maturity index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling. **Plant and soil**. v. 212, n. 1, p. 13-22, 1999.
- BONGERS, Tom. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. **Oecologia**. v. 83, n. 1, p. 14-19, 1990.
- BONGERS, Tom; BONGERS, Marina. Functional diversity of nematodes. **Applied Soil Ecology**. v. 10, n. 3, p. 239-251, 1998.
- BONGERS, Tom; FERRIS, Howard. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 14, n. 6, p. 224-228, 1999.
- BOUKADIDA, Khoulood et al. High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase. **Marine environmental research**. v. 122, p. 59-66, 2016.

- BRENNER, Sydney. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.
- BROWN, Bruce K. The Use of Plasticizers in Lacquers. **Industrial & Engineering Chemistry**. v. 17, n. 6, p. 568-569, 1925.
- CAIRNS JR, John; HEATH, Alan G; PARKER, Bruce C. Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms. **Water Pollution Control Federation**. v. 47, n. 2, p. 267-280, 1975.
- CAMPANI, Tommaso et al. Presence of plastic debris in loggerhead turtle stranded along the Tuscany coasts of the Pelagos Sanctuary for Mediterranean Marine Mammals (Italy). **Marine pollution bulletin**. v. 74, n. 1, p. 225-230, 2013.
- CARPENTER, Edward J et al. Polystyrene spherules in coastal waters. **Science**. v. 178, n. 4062, p. 749-750, 1972.
- CHANGE, IPCC Climate. Mitigation of climate change. **Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. v. 1454, 2014.
- CHENG, Zhang et al. Occurrence and distribution of phthalate esters in freshwater aquaculture fish ponds in Pearl River Delta, China. **Environmental Pollution**. v. 245, p. 883-888, 2019.
- COLE, Matthew et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. **Marine pollution bulletin**. v. 62, n. 12, p. 2588-2597, 2011.
- COLLINS, Matthew et al. Long-term climate change: projections, commitments and irreversibility. 2013.
- CORRADETTI, Bruna et al. Bis-(2-ethylexhyl) phthalate impairs spermatogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). **Reproductive biology**. v. 13, n. 3, p. 195-202, 2013.
- DA SILVA SPINACÉ, Márcia Aparecida; DE PAOLI, Marco Aurelio. A tecnologia da reciclagem de polímeros. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.
- DANOVARO, Roberto et al. Trophic importance of subtidal metazoan meiofauna: evidence from in situ exclusion experiments on soft and rocky substrates. **Marine Biology**. v. 152, n. 2, p. 339-350, 2007.
- DE MEESTER, Nele et al. Temperature and salinity induce differential responses in life histories of cryptic nematode species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 472, p. 54-62, 2015a.
- DE MEESTER, Nele; DERYCKE, Sofie; MOENS, Tom. Differences in time until dispersal between cryptic species of a marine nematode species complex. **PloS one**. v. 7, n. 8, p. e42674, 2012.
- DERRAIK, Jose GB. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine pollution bulletin**. v. 44, n. 9, p. 842-852, 2002.

- DERYCKE, Sofie et al. Coexisting cryptic species of the *Litoditis marina* complex (Nematoda) show differential resource use and have distinct microbiomes with high intraspecific variability. **Molecular ecology**. v. 25, n. 9, p. 2093-2110, 2016.
- DERYCKE, Sofie et al. Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioiditis marina*. **Marine Ecology Progress Series**. v. 300, p. 91-103, 2005.
- DERYCKE, Sofie et al. Phylogeography of the *Rhabditis (Pellioiditis) marina* species complex: evidence for long-distance dispersal, and for range expansions and restricted gene flow in the northeast Atlantic. **Molecular ecology**. v. 17, n. 14, p. 3306-3322, 2008.
- DOS SANTOS, GAP et al. Differential effects of food availability on population growth and fitness of three species of estuarine, bacterial-feeding nematodes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 355, n. 1, p. 27-40, 2008.
- DOS SANTOS, Giovanni AP et al. Interactions among bacterial-feeding nematode species at different levels of food availability. **Marine Biology**. v. 156, n. 4, p. 629-640, 2009.
- DREVER, Mark C et al. Are ocean conditions and plastic debris resulting in a 'double whammy' for marine birds? **Marine pollution bulletin**. v. 133, p. 684-692, 2018.
- ERIKSEN, Marcus et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. **PloS one**. v. 9, n. 12, p. e111913, 2014.
- EVANS, Gary W. Projected behavioral impacts of global climate change. **Annual review of psychology**. v. 70, p. 449-474, 2019.
- FÉLIX, Marie-Anne; BRAENDLE, Christian. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. **Current biology**. v. 20, n. 22, p. R965-R969, 2010.
- FLEEGER, JW; CHANDLER, GT. Meiofauna responses to an experimental oil spill in a Louisiana salt marsh. **Marine Ecology Progress Serie**. v. 11, p. 257-264, 1983.
- FOSTER, Paul. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International journal of andrology**. v. 29, n. 1, p. 140-147, 2006.
- FRECKMAN, Diana W. **Bacterivorous nematodes and organic-matter decomposition. Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 24, n. 1-3, p. 195-217, 1988.
- FROMME, Hermann et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water research**. v. 36, n. 6, p. 1429-1438, 2002.
- FRY, D Michael; FEFER, Stewart I; SILEO, Louis. Ingestion of plastic debris by Laysan albatrosses and wedge-tailed shearwaters in the Hawaiian Islands. **Marine pollution bulletin**. v. 18, n. 6, p. 339-343, 1987.
- FRY, D Michael; FEFER, Stewart I; SILEO, Louis. Ingestion of plastic debris by Laysan albatrosses and wedge-tailed shearwaters in the Hawaiian Islands. **Marine pollution bulletin**. v. 18, n. 6, p. 339-343, 1987.
- GALL, Sarah C; THOMPSON, Richard C. The impact of debris on marine life. **Marine pollution bulletin**. v. 92, n. 1-2, p. 170-179, 2015.

- GAO, Da-Wen; WEN, Zhi-Dan. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. **Science of the Total Environment**. v. 541, p. 986-1001, 2016.
- GESLER, Robert M. Toxicology of di-2-ethylhexyl phthalate and other phthalic acid ester plasticizers. **Environmental health perspectives**. v. 3, p. 73, 1973.
- GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science advances**. v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.
- GIAM, Co S et al. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. **Science**. v. 199, n. 4327, p. 419-421, 1978.
- GIERE, Olav. Meiobenthology: the microscopic motile fauna of aquatic sediments. ed.: **Springer Science & Business Media**, 2008.
- GOBAS, Frank APC et al. Bioaccumulation of phthalate esters in aquatic food-webs. In: Series Anthropogenic Compounds: ed.: **Springer**, v. p.201-225, 2003.
- GOLDSTEIN, Miriam C; ROSENBERG, Marci; CHENG, Lanna. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. **Biology letters**. v. 8, n. 5, p. 817-820, 2012.
- GORNI, Antonio Augusto. Introdução aos plásticos. **Revista plástico industrial**. v. 10, n. 09, 2003.
- GOURMELON, Gaëlle. Global plastic production rises, recycling lags. **New Worldwatch Institute analysis explores trends in global plastic consumption and recycling**. Recuperado de <http://www.worldwatch.org>. 2015.
- HÄGERBÄUMER, Arne et al. Experimental studies with nematodes in ecotoxicology: An overview. **Journal of nematology**. v. 47, n. 1, p. 11, 2015.
- HAMMER, Chad; VANBROCKLIN, Hope. Microplastic Bioaccumulation in invertebrates, fish, and cormorants in Lake Champlain. 2016.
- HERMABESSIERE, Ludovic et al. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. **Chemosphere**. v. 182, p. 781-793, 2017.
- HUANG, Po-Chin et al. Occurrence of phthalates in sediment and biota: relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. **Chemosphere**. v. 73, n. 4, p. 539-544, 2008.
- ILIEVA-MAKULEC, K. A comparative study of the life strategies of two bacterial-feeding nematodes under laboratory conditions. 3, Influence on the initial nematode density on the interactions of *Arobelloides nanus* (de Man 1880) Anderson and *Dolichorhabditis dolichura* Schnei. **Polish Journal of Ecology**. v. 49, n. 2, p. 137-144, 2001.
- INGELS, Jeroen et al. Short-term CO₂ exposure and temperature rise effects on metazoan meiofauna and free-living nematodes in sandy and muddy sediments: Results from a flume experiment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 502, p. 211-226, 2018.

- JACOBSEN, Jeff K; MASSEY, Liam; GULLAND, Frances. Fatal ingestion of floating net debris by two sperm whales (*Physeter macrocephalus*). **Marine pollution bulletin**. v. 60, n. 5, p. 765-767, 2010.
- JAEGER, RJ; RUBIN, RJ. Di-2-ethylhexyl Phthalate, a Plasticizer Contaminant of Platelet Concentrates. **Transfusion**. v. 13, n. 2, p. 107-108, 1973.
- JAEGER, Rudolph J; RUBIN, Robert J. Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. **New England Journal of Medicine**. v. 287, n. 22, p. 1114-1118, 1972.
- JAMBECK, Jenna R et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**. v. 347, n. 6223, p. 768-771, 2015.
- JESUS, Murillo Fernando de Souza. Estrutura da meiofauna em praia arenosa subtropical com ênfase no filo Nematoda. 2014.
- JOHNSON, B Thomas; HEITKAMP, Michael A; JONES, John R. Environmental and chemical factors influencing the biodegradation of phthalic acid esters in freshwater sediments. Environmental Pollution Series B, **Chemical and Physical**. v. 8, n. 2, p. 101-118, 1984.
- KAPOSI, Katrina L et al. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. **Environmental science & technology**. v. 48, n. 3, p. 1638-1645, 2014.
- KENNEDY, Andrew D; JACOBY, Charles A. Biological indicators of marine environmental health: meiofauna—a neglected benthic component? **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 54, n. 1, p. 47-68, 1999.
- KOELMANS, Albert A; BESSELING, Ellen; FOEKEMA, Edwin M. Leaching of plastic additives to marine organisms. **Environmental Pollution**. v. 187, p. 49-54, 2014.
- KOTLER, Philip; KARTAJAYA, Hermawan; SETIAWAN, Iwan. Marketing 3.0. ed.: **Elsevier Brasil**, 2012.
- KRAMER, MJ; BELLWOOD, O; BELLWOOD, DR. The trophic importance of algal turfs for coral reef fishes: the crustacean link. **Coral Reefs**. v. 32, n. 2, p. 575-583, 2013.
- KROEKER, Kristy J et al. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. **Global change biology**. v. 19, n. 6, p. 1884-1896, 2013.
- KWOK, KWH; LEUNG, Kenneth MY. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): effects of temperature and salinity. **Marine pollution bulletin**. v. 51, n. 8-12, p. 830-837, 2005.
- LAIST, David W. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. **Marine pollution bulletin**. v. 18, n. 6, p. 319-326, 1987.
- LIANG, Da-Wei et al. Phthalates biodegradation in the environment. Applied microbiology and **Biotechnology**. v. 80, n. 2, p. 183, 2008.

- LIRA, VF et al. Effects of barium and cadmium on the population development of the marine nematode *Rhabditis (Pellioditis) marina*. **Marine environmental research**. v. 72, n. 4, p. 151-159, 2011.
- LU, Yonggang; LIN, Minjie; AITKEN, Robert John. Exposure of spermatozoa to dibutyl phthalate induces abnormal embryonic development in a marine invertebrate *Galeolaria caespitosa* (Polychaeta: Serpulidae). **Aquatic Toxicology**. v. 191, p. 189-200, 2017.
- MACHOVSKY-CAPUSKA, Gabriel E et al. A nutritional perspective on plastic ingestion in wildlife. **Science of the Total Environment**. v. 656, p. 789-796, 2019.
- MACKINTOSH, Cheryl E et al. Distribution of phthalate esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. **Environmental science & technology**. v. 38, n. 7, p. 2011-2020, 2004.
- MANIKKAM, Mohan et al. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. **PloS one**. v. 8, n. 1, p. e55387, 2013.
- MARE, Molly F. A study of a marine benthic community with special reference to the micro-organisms. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 25, n. 3, p. 517-554, 1942.
- MARTINEZ, Joey Genevieve et al. Effects of cadmium on the fitness of, and interactions between, two bacterivorous nematode species. **Applied Soil Ecology**. v. 56, p. 10-18, 2012.
- MAYER, Foster L; STALLING, David L; JOHNSON, James L. Phthalate esters as environmental contaminants. **Nature**. v. 238, n. 5364, p. 411-413, 1972.
- MEVENKAMP, Lisa et al. Hydrostatic pressure and temperature affect the tolerance of the free-living marine nematode *Halomonhystera disjuncta* to acute copper exposure. **Aquatic Toxicology**. v. 192, p. 178-183, 2017.
- MOENS, Tom; VINCX, Magda. Temperature and salinity constraints on the life cycle of two brackish-water nematode species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 243, n. 1, p. 115-135, 2000.
- MONTEIRO, Luana C et al. Differential heavy-metal sensitivity in two cryptic species of the marine nematode *Litoditis marina* as revealed by developmental and behavioural assays. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 502, p. 203-210, 2018.
- MORENO, Mariapaola et al. The use of nematodes in assessing ecological quality status in the Mediterranean coastal ecosystems. **Ecological indicators**. v. 11, n. 2, p. 328-336, 2011.
- MOSER, Mary L; LEE, David S. A fourteen-year survey of plastic ingestion by western North Atlantic seabirds. **Colonial Waterbirds**. p. 83-94, 1992.
- NEERGAARD, J et al. Plasticizers in PVC and the Occurrence of Hefatitis in A Haemodialysis Unit: A Preliminary Communication. **Scandinavian journal of urology and nephrology**. v. 5, n. 2, p. 141-145, 1971.
- NEGRI, Alessandro et al. Transcriptional response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following exposure to heat stress and copper. **PloS one**. v. 8, n. 6, p. e66802, 2013.

- NEMATOLLAHI, Jay; GUESS, Wallace L; AUTIAN, John. Plasticizers in medical application I. Analysis and toxicity evaluation of dialkyl benzenedicarboxylates. **Journal of pharmaceutical sciences**. v. 56, n. 11, p. 1446-1453, 1967.
- NEWELL, RC; BRANCH, GM. The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. In: *Advances in marine biology*: ed.: Elsevier, v. 17. p.329-396, 1980.
- NIKONOROW, M; MAZUR, H; PIEKACZ, H. Effect of orally administered plasticizers and polyvinyl chloride stabilizers in the rat. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 26, n. 2, p. 253-259, 1973.
- O'CONNOR, Mary I et al. Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 4, p. 1266-1271, 2007.
- PEIJNENBURG, Willie JGM; STRUIJS, Jaap. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 63, n. 2, p. 204-215, 2006.
- PEIJNENBURG, Willie JGM; STRUIJS, Jaap. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 63, n. 2, p. 204-215, 2006.
- PEREIRA, Cecília et al. Effect of temperature on chronic toxicity of copper, zinc, and nickel to *Daphnia magna*. **Environmental toxicology and chemistry**. v. 36, n. 7, p. 1909-1916, 2017.
- PETERS, JW; COOK, RM. Effect of phthalate esters on reproduction in rats. **Environmental health perspectives**. v. 3, p. 91, 1973.
- PETERSEN, Jillian M et al. Chemosynthetic symbionts of marine invertebrate animals are capable of nitrogen fixation. **Nature microbiology**. v. 2, n. 1, p. 16195, 2017.
- PLATT, HM; WARWICK, RM. The significance of free-living nematodes to the littoral ecosystem. The significance of free-living nematodes to the littoral ecosystem., p. 729-759, 1980.
- PORTE, C et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. v. 143, n. 3, p. 303-315, 2006.
- RAES, Maarten; VANREUSEL, Ann. Microhabitat type determines the composition of nematode communities associated with sediment-clogged cold-water coral framework in the Porcupine Seabight (NE Atlantic). *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. v. 53, n. 12, p. 1880-1894, 2006.
- REIS, Michele Tamara; BRAIBANTE, Mara Elisa Fortes; MIRANDA, Ana Carolina Gomes. Esmalte de unhas: Uma temática para a construção do conhecimento químico de funções orgânicas. **Experiências em ensino de ciências**. v. 12, n. 8, 2017.
- ROSE, RJ et al. The effect of temperature on di (2-ethylhexyl) phthalate leaching from PVC infusion sets exposed to lipid emulsions. **Anaesthesia**. v. 67, n. 5, p. 514-520, 2012.

- SANDERS, Herman O; MAYER, Foster L; WALSH, David F. Toxicity, residue dynamics, and reproductive effects of phthalate esters in aquatic invertebrates. **Environmental research**. v. 6, n. 1, p. 84-90, 1973.
- SETÄLÄ, Outi et al. Microplastics in Marine Food Webs. In: Microplastic Contamination in Aquatic Environments: ed.: **Elsevier**, v. p.339-363, 2018.
- SETÄLÄ, Outi; NORKKO, Joanna; LEHTINIEMI, Maiju. Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. **Marine pollution bulletin**. v. 102, n. 1, p. 95-101, 2016.
- SHEIKH, Ishfaq A et al. Endocrine disruption: computational perspectives on human sex hormone-binding globulin and phthalate plasticizers. **PLoS one**. v. 11, n. 3, p. e0151444, 2016.
- SOKOLOVA, Inna M; LANNIG, Gisela. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. **Climate Research**. v. 37, n. 2-3, p. 181-201, 2008.
- SOLBAKKEN, J. E.; KNAP, A. H.; ORR, P. L. Uptake and elimination of lindane and a phthalate ester in tropical corals and mussels. **Marine Environmental Research**. v. 16, n. 2, p. 103-113, 1985. DOI:[https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90012-1). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141113685900121>.
- SOTO, Luis A et al. Interannual patterns of the large free-living nematode assemblages in the Mexican Exclusive Economic Zone, NW Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill. **Ecological indicators**. v. 79, p. 371-381, 2017.
- STAPLES, Charles A et al. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. **Chemosphere**. v. 35, n. 4, p. 667-749, 1997.
- STATISTA. Production of plastics worldwide from 1950 to 2017 (in million metric tons). The **Statistics Portal**, 2019. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>. Acesso em 02 de Fevereiro.
- STEFATOS, A et al. Marine debris on the seafloor of the Mediterranean Sea: examples from two enclosed gulfs in Western Greece. **Marine pollution bulletin**. v. 38, n. 5, p. 389-393, 1999.
- SUDHAUS, W. Phylogenetic systematisation and catalogue of paraphyletic "Rhabditidae"(Secernentea, Nematoda). **Journal of Nematode Morphology and Systematics**. v. 14, n. 2, p. 113-178, 2011.
- SUGAWARA, Naoki. Toxic effect of a normal series of phthalate esters on the hatching of shrimp eggs. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 30, n. 1, p. 87-89, 1974.
- THATJE, Sven; HALL, Sally. The effect of temperature on the evolution of per offspring investment in a globally distributed family of marine invertebrates (Crustacea: Decapoda: Lithodidae). **Marine Biology**. v. 163, n. 3, p. 48, 2016.
- TSENG, I-Ling et al. Phthalates induce neurotoxicity affecting locomotor and thermotactic behaviors and AFD neurons through oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS one**. v. 8, n. 12, p. e82657, 2013.

- VANFLETEREN, JR. Nematodes as nutritional models. **Nematodes as biological models**. v. 2, p. 47-79, 1980.
- VAQUER-SUNYER, Raquel; DUARTE, Carlos M. Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marine benthic organisms. **Global change biology**. v. 17, n. 5, p. 1788-1797, 2011.
- VIERSTRAETE, Tom Moens Andy; VINCX, Magda. Life strategies in two bacterivorous marine nematodes: preliminary results. **Marine Ecology**. v. 17, n. 1-3, p. 509-518, 1996.
- VITOUSEK, Peter M. Beyond global warming: ecology and global change. **Ecology**. v. 75, n. 7, p. 1861-1876, 1994.
- VRANKEN, G et al. A re-evaluation of marine nematode productivity. **Hydrobiologia**. v. 135, n. 3, p. 193-196, 1986.
- VRANKEN, G; VANDERHAEGHEN, R; HEIP, Carlos. Effects of pollutants on life-history parameters of the marine nematode *Monhystera disjuncta*. **ICES Journal of Marine Science**. v. 48, n. 3, p. 325-334, 1991.
- VRANKEN, G; VANDERHAEGHEN, R; HEIP, CHR. Toxicity of cadmium to free-living marine and brackish water nematodes (*Monhystera microphthalma*, *Monhystera disjuncta*, *Pellioiditis marina*). **Diseases of Aquatic Organisms**. 1985.
- WAN, Zhiqin et al. Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. **Chemosphere**. 2018.
- WEI, Xi et al. Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China. **Chemosphere**. v. 85, n. 1, p. 122-128, 2011.
- WILSON, Michael J; KHAKOULI-DUARTE, Thomae. **Nematodes as environmental indicators**. ed.: CABI, 2009.
- WRIGHT, Stephanie L; THOMPSON, Richard C; GALLOWAY, Tamara S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**. v. 178, p. 483-492, 2013.
- XU, Xiang-Rong; LI, Xiao-Yan. Adsorption behaviour of dibutyl phthalate on marine sediments. **Marine pollution bulletin**. v. 57, n. 6-12, p. 403-408, 2008.
- ZHANG, Ze-Ming et al. Distribution and ecotoxicological state of phthalate esters in the sea-surface microlayer, seawater and sediment of the Bohai Sea and the Yellow Sea. **Environmental Pollution**. v. 240, p. 235-247, 2018b.
- ZHANG, Ze-Ming et al. Occurrence, distribution, and ecological risks of phthalate esters in the seawater and sediment of Changjiang River Estuary and its adjacent area. **Science of the Total Environment**. v. 619, p. 93-102, 2018a.
- ZHOU, Jin; CAI, Zhong-Hua; XING, Ke-Zhi. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. **Environmental pollution**. v. 159, n. 5, p. 1114-1122, 2011.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho mostraram que o Dibutil ftalato demonstrou alta toxicidade nos nematoides de vida livre *Litoditis marina* e *Diplolaimelloides oschei* mesmo em baixas concentrações, pois modificaram os parâmetros populacionais desses organismos quando analisados individualmente. Há possíveis comparações entre os manuscritos I e II referente a tamanhos populacionais de *L. marina*. No manuscrito I todas as populações (Total, jovens e adultos) além da taxa de oviposição mostraram sensibilidade ao DBP em todos os tratamentos analisados, conferindo um menor tamanho populacional ao passo que a concentração aumentava, exceto para oviposição diária que não havia padrão de aumento entre diferentes concentração e a taxa de crescimento. O resultado foi semelhante foi visto no teste 1 do manuscrito II, o que se conclui que a presença de *D. oschei* não foi um fato determinante na diminuição da população de *L. marina*, porém a taxa de oviposição teve uma queda brusca em relação ao primeiro manuscrito, concluindo-se que *L. marina* pode ter apresentado uma maior viviparidade na presença de *D. oschei*. Além disso, foi comprovado que o aumento da temperatura é um potencial fator que aumenta a toxicidade do DBP frente a esses organismos, podendo modificar estruturas populacionais. No entanto, investigações mais específicas são requeridas para que nossos resultados possam ser traduzidos em ambientes naturais, já que no presente estudo, foram estudados fatores isolados, e no ambiente natural, todos esses fatores são conjuntos e ainda adicionados a centenas de outros contaminantes e fatores abióticos. A presente pesquisa mostrou que as espécies aqui estudadas foram excelentes biomodelos e espera-se que maiores contribuintes analisem os efeitos do DBP em espécies tropicais para que a legislação vigente seja reavaliada e o uso do DBP torne-se restrito ou proibido visto os malefícios aqui citados.