

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

TOXICIDADE DO TRIBUTILESTANHO (TBT) PARA O COPÉPODO
MARINHO *TISBE BIMINIENSIS*

Bruno Varella Motta da Costa

Recife

2013

BRUNO VARELLA MOTTA DA COSTA

Toxicidade do tributilestanho (TBT) para o copépodo marinho *Tisbe biminiensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (PPGO-UFPE), como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Oceanografia.

Orientador: **Prof. Dr. Gilvan Takeshi Yogui**

Co-Orientadora: **Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos**

Recife

2013

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

C837t Costa, Bruno Varella Motta da.

Toxicidade do tributilestanho (TBT) para o copépodo marinho *Tisbe biminiensis* / Bruno Varella Motta da Costa. - Recife: O Autor, 2013.
xii, 103 folhas; il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Takeshi Yogui.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lília Pereira de Souza Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2013.

c

Inclui Referências.

1.Oceanografia. 2. Tributilestanho. 3. Toxicidade para crustáceos. I. Yogui, Gilvan Takeshi (Orientador). II. Santos, Lília Pereira de Souza (Co-orientadora). III. Título.

551.46 CDD (22. ed.)

UFPE/BCTG/2012-193

Toxicidade do tributilestanho (TBT) para o copépodo marinho *Tisbe biminiensis*

Bruno Varella Motta da Costa

Folha de aprovação – Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilvan Takeshi Yogui
(Orientador e Presidente da Banca)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho
(Universidade Federal de Pernambuco)

Profa. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
(Universidade Estadual Paulista)

*"Quem nos separará do amor de Cristo? Será tribulação, ou angústia, ou
perseguição, ou fome, ou nudez, ou perigo, ou espada?
Como está escrito: "Por amor de ti enfrentamos a morte todos os dias; somos
considerados como ovelhas destinadas ao matadouro".
Mas, em todas estas coisas somos mais que vencedores, por meio daquele que
nos amou.
Pois estou convencido de que nem morte nem vida, nem anjos nem demônios,
nem o presente nem o futuro, nem quaisquer poderes,
nem altura nem profundidade, nem qualquer outra coisa na criação será capaz
de nos separar do amor de Deus que está em Cristo Jesus, nosso Senhor."*

Romanos 8:35-39

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Pai, que desde o ventre de minha mãe tem me abençoado. Quando penso em desistir, Ele me diz: “Tem bom ânimo”; quando tenho medo, “Não temas, Eu sou contigo”; quando estou fraco, “Diga o fraco: eu sou forte”.

Aos meus pais, Fred e Suzana, que investiram em minha vida e hoje, juntamente comigo, colhem os frutos de seus investimentos.

Aos meus orientadores, Gilvan Yogui e Lília Santos, pelas oportunidades que me deram. Trabalhei sob a orientação de pessoas honestas e dedicadas, que catalisaram meu crescimento acadêmico.

Aos meus amigos do OrganoMar, Dani Miranda, Rafael, Dani Maciel, Daidson, Nikon, Nicole, Áurea, e claro, a professora Eliete.

Aos meus amigos do LACE, Bia, Cíntia, Deloar, Lela, Rafa, Roberta e Ramon pela companhia e por todos os momentos agradáveis que me proporcionaram. A amiga Xiomara, pelas conversas e bom momentos juntos.

Aos meus amigos do curso de Ciências Ambientais, com quem tive o prazer de estudar na minha graduação.

Aos meus colegas de turma do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da UFPE (PPGO-UFPE).

Aos colegas que trabalham do Departamento de Oceanografia da UFPE, em especial a todos os professores que me ensinaram lições importantes na vida acadêmica, profissional e sobre relacionamentos.

Aos meus queridos irmãos do Ministério Rugido do Leão e da Igreja Obreiros de Cristo, com os quais tenho a honra de viver e desfrutar momentos inesquecíveis de comunhão.

A minha preciosa namorada Márcia, com quem sonho e construo nosso futuro.

Ao Departamento de Oceanografia, por todo investimento em meu projeto de mestrado e na minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Boxplot demonstrando a variação das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) registradas para espécies de crustáceos. À esquerda do boxplot estão representadas as CL_{50} medianas calculadas para Classes do subfiló Crustacea..... 20
- Figura 2 – Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas por Classes do subfiló Crustacea (Copepoda, Malacostraca, Cirripedia e Branchiopoda). Os números entre parênteses equivalem ao N amostral..... 21
- Figura 3 - Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) para crustáceos de água salgada (copépodos) e de água doce (cladóceros). Os números entre parênteses equivalem ao N amostral..... 22
- Figura 4 – Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas por tipo de teste (estático, semi-estático e fluxo contínuo). Os números entre parênteses equivalem ao N amostral..... 23
- Figura 5 – Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas pelo tempo de avaliação dos bioensaios (1 a 31 dias). Nos bioensaios com 14, 20 e 31 dias estão registrados apenas um valor de CL_{50} , impossibilitando a construção do boxplot. 24
- Figura 6 - Gráficos de dispersão apresentando a modelagem da relação CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função do tempo de avaliação (dias) para os crustáceos (A), copépodos (B) e cladóceros (C). Na parte superior do gráfico estão as equações do modelo geométrico ($y = ax^b$) e o coeficiente de determinação (R^2)..... 24
- Figura 7 - Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas de acordo com o grupo aniônico ligado à molécula de TBT. Para as moléculas acetato, acrilato, benzoato e sulfeto só foram registrados um valor de CL_{50} , impossibilitando a construção do boxplot. Para a molécula naftenato de TBT (N = 2) também não foi possível construir o boxplot. Os números entre parênteses equivalem ao N amostral..... 25
- Figura 8 - Gráficos de dispersão apresentando a CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função do peso molecular (A), solubilidade em água (mg L^{-1}) (B), $\log K_{ow}$ (C) e $\log K_{oc}$ (D) das moléculas de TBT..... 26
- Figura 9 – Esquema de preparo das soluções estoque, intermediária e trabalho para os bioensaios com *T. biminiensis*. As soluções-teste equivalem às concentrações de tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$) dissolvido na água dos recipientes dos bioensaios..... 36
- Figura 10 – Número médio de fêmeas de *Tisbe biminiensis* mortas em função da concentração de tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$) nos cinco bioensaios com 48 h de duração. As barras de erro em cada concentração representam ± 1 desvio padrão..... 40
- Figura 11 – Registro das CL_{50-48h} do tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$) para as fêmeas de *Tisbe biminiensis* obtidas em cada bioensaio e a média das mesmas. As barras de erro

em torno das CL_{50} de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CL_{50} média, as barras de erro representam ± 2 desvios padrões..... 41

Figura 12 – Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE) de copépodos ao tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$). Os círculos representam as espécies planctônicas e os triângulos as espécies bentônicas. Cada ponto equivale à média geométrica para cada espécie de copépodo. As médias geométricas foram calculadas a partir dos dados reportados na Tabela 6. 44

Figura 13 – Razões entre CL_{50} de TBT para quatro espécies de copépodos: *Tisbe biminiensis* – este estudo; *Tisbe battagliai* - MACKEN *et al.* (2008); *Acartia tonsa* - U'REN *et al.* (1983); *Eurytemora affinis* - BUSHONG *et al.* (1988) e HALL *et al.* (1988). 46

Figura 14 - Esquema para preparo do sedimento, das soluções estoque e trabalho, bem como a fortificação e envelhecimento da fração lamosa utilizada nos bioensaios com *Tisbe biminiensis*. 53

Figura 15 – Número médio de fêmeas de *Tisbe biminiensis* mortas em função das concentrações de tributilestanho (TBT) adsorvido ao sedimento ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.u.) em três bioensaios com 96 h de duração. Os bioensaios 1, 2 e 3 estão representados nos painéis A, B e C, respectivamente. As barras de erro em cada concentração representam ± 1 desvio padrão. 58

Figura 16 - Registro da CL_{50-96h} do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa úmida para as fêmeas de *Tisbe biminiensis*. Os resultados estão apresentados em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C). As barras de erro em torno da CL_{50} de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CL_{50} média, as barras representam ± 2 desvios padrões. 59

Figura 17 - Efeito de tributilestanho (TBT) adsorvido à lama úmida sobre a fecundidade total média (náuplios + copepoditos) das fêmeas de *Tisbe biminiensis* em três bioensaios de 96 h. Os asteriscos indicam a concentração de efeito observado (CEO) em cada bioensaio. As concentrações 0 e CS representam a fecundidade total no controle e no controle do solvente, respectivamente. As barras de erro em cada concentração representam um desvio padrão. Os bioensaios 1, 2 e 3 estão representados nos painéis A, B e C, respectivamente. 60

Figura 18 - Registro da CE_{50-96h} do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa úmida para as fêmeas de *Tisbe biminiensis*. Os resultados estão apresentados em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C). As barras de erro em torno da CL_{50} de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CL_{50} média, as barras representam ± 2 desvios padrões. 61

Figura 19 - Número médio de fêmeas de *Tisbe biminiensis* mortas em função das concentrações de tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa liofilizada ($\mu\text{g g}^{-1}$

peso úmido) nos bioensaios com 10, 20 e 30 dias após liofilização. As barras de erro em cada concentração representam ± 1 desvio padrão. 62

Figura 20 - Registro da CL₅₀-96h do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa liofilizada em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C) para as fêmeas de *Tisbe biminiensis*. As barras de erro em torno da CL₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). 63

Figura 21 - Efeito do tributilestanho (TBT) após 20 e 30 dias de liofilização sobre a fecundidade total média (náuplios + copepoditos) das fêmeas de *Tisbe biminiensis* em dois bioensaios de 96 h. Os asteriscos indicam a concentração de efeito observado (CEO) em cada bioensaio. As concentrações 0 e CS representam a fecundidade total no controle e no controle do solvente, respectivamente. As barras de erro em cada concentração representam um desvio padrão. 64

Figura 22 - Registro da CE₅₀-96h do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa liofilizada em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C) sobre a fecundidade total (náuplios + copepoditos) das fêmeas de *Tisbe biminiensis*. As barras de erro em torno da CE₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CE₅₀ média, as barras de erro representam ± 2 desvios padrões. 65

Figura 23 – Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) mínimas e máximas de TBT no sedimento em termos de peso seco em diferentes de regiões costeiras do Brasil. O círculo representa as concentrações médias. As linhas verticais em vermelho representam os níveis estabelecidos na Resolução CONAMA 454 em termos de peso seco. Referências: (1) GODOI *et al.* (2003); (2) ALMEIDA *et al.* (2004); (3) FERNANDEZ *et al.* (2005); (4) FELIZZOLA *et al.* (2008); (5) PLETSCH *et al.* (2010); (6) OLIVEIRA *et al.* (2010); (7) SANTOS *et al.* (2009). 70

Figura 24 – Escala de efeitos do TBT sobre os copépodos. Os efeitos e as concentrações crônicas foram obtidas a partir dos resultados reportados na Tabela 9. A concentração letal é a CL₅₀ mediana do TBT para copépodos adultos, obtida a partir dos resultados reportados por KEGLEY *et al.* (2011) e pelo presente trabalho. 74

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Categorias de contaminantes liberados no ambiente marinho. Adaptado de GESAMP (2009). COV: compostos orgânicos voláteis; POP: poluentes orgânicos persistentes; HPA: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.	1
Tabela 2 – Concentrações recentes de tributilestanho (TBT) no sedimento ($\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ peso seco) registradas em diferentes regiões.....	9
Tabela 3 - Moléculas de tributilestanho com suas propriedades físico-químicas, fator de bioconcentração (FBC) estimado e fator para conversão das CL_{50} para base de tributilestanho.	19
Tabela 4 – Limites regulatórios do tributilestanho (TBT) estabelecidos em critérios de qualidade da água no Brasil, EUA, Canadá, Austrália e Comunidade Européia.	30
Tabela 5 - Comparação dos pares das CL_{50} -48h pela fórmula proposta por Sprague e Fogels (1976). Valores positivos indicam diferença entre pares de CL_{50} -48h.....	41
Tabela 6 - Comparação da sensibilidade de <i>Tisbe biminiensis</i> com outras espécies de copépodos. CL_{50} : concentração letal a 50% dos organismos; CENO: concentração de efeito não observado; CEO: concentração de efeito observado. Todos os valores em $\mu\text{g TBT L}^{-1}$	44
Tabela 7 - Variação das concentrações de tributilestanho (TBT) na fração lamosa ($\mu\text{g g}^{-1}$ matéria orgânica) e na água intersticial (AI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) e das CL_{50} -96h para cada uma destas vias de exposição. As concentrações de TBT na água intersticial foram obtidas a partir das concentrações nominais de TBT adsorvido à fração lamosa segundo predição feita pela teoria de equilíbrio de partição ((DI TORO <i>et al.</i> , 1991).	67
Tabela 8 - CL_{50} e resíduo tecidual crítico (<i>critical-body-residue</i> , CBR) de contaminantes orgânicos para diferentes espécies de animais.	69
Tabela 9 - Estimativas das concentrações de tributilestanho (TBT) que causam efeitos crônicos em diferentes espécies de copépodos. CL_{50} : concentração letal a 50% dos organismos expostos; CEO: concentração de efeito observável; CE_{50} : concentração que reduziu em 10% ou 50% o parâmetro sob consideração após o período de exposição..	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise da Variância
CAS	Chemical Abstracts Service
CBR	Critical-body-residue ou Concentração residual crítica ao organismo
CENO	Concentração de efeito não observável
CEO	Concentração de efeito observável
CL ₅₀	Concentração letal a 50% dos organismos expostos ao bioensaio
CONI	Composto orgânico não iônico
CMC	Critério de Máxima Concentração
DBT	Dibutyltin ou Dibutilestanho
dp	Desvio padrão
DSE	Distribuição de Sensibilidade das Espécies
EqP	Equilibrium Partitioning ou Partição no Equilíbrio
FBC	Fator de bioconcentração
GESAMP	Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution
IMO	International Maritime Organization
MBT	Monobutyltin ou Monobutilestanho
m.o.	matéria orgânica
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
nd	não detectado
NORMAM	Norma da Autoridade Marítima do Brasil
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PANNA	Pesticide Action Network North America
PCB	Polychlorinated Biphenyls ou Bifenilas Policloradas
R ²	Coeficiente de determinação
p.s.	peso seco

p.u.	peso úmido
SAI	Sistemas Anti-Incrustantes
TBT	Tributyltin ou Tributilestanho
TBTCl	Cloreto de tributilestanho
TBTO	Óxido de tributilestanho
TO	Teor orgânico
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
VAF	Valor Agudo Final
K_d	Coeficiente de distribuição
K_{DOC}	Coeficiente de partição carbono orgânico dissolvido-água
K_{oc}	Coeficiente de partição carbono orgânico-água
K_{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
KW	Teste de Kruskall-Wallis

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1

Revisão da CL_{50} dos compostos de TBT agrupados por espécie. Legenda: Amb.: Ambiente (E – estuarino, M – marinho, D – dulcícola); EV – estágio de vida; TT – tipo de teste (E – estático, SE – semi-estático, F – fluxo contínuo); Ânion: grupo aniônico ligado ao TBT; CL_{50} : concentração letal a 50% dos organismos expostos ($\mu\text{g L}^{-1}$); TE – tempo de exposição (dias).

RESUMO

O tributilestanho (TBT) é muito tóxico para organismos marinhos e tem sido reportado como interferente endócrino para moluscos e crustáceos. Os objetivos deste trabalho foram revisar a toxicidade aguda do TBT para crustáceos e avaliar a toxicidade deste contaminante na água e no sedimento para o copépodo *Tisbe biminiensis*. A revisão da toxicidade foi realizada a partir de dados extraídos da base de dados da *Pesticide Action Network* (PAN). Os dados foram agrupados por critérios taxonômicos, experimentais e químicos. A revisão indicou que as espécies de copépodos são mais sensíveis ao TBT em relação a outros grupos de crustáceos. Não há diferenças significativas entre os resultados de testes estático, semi-estático e de fluxo contínuo. Também não há diferença de toxicidade entre os compostos mais empregados em bioensaios: óxido, fluoreto e cloreto de TBT. A toxicidade aguda do TBT na água para fêmeas ovígeras de *T. biminiensis* foi avaliada em exposições de 48 h. As CL_{50} -24h e CL_{50} -48h médias foram 37 e 36 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectivamente. A razão entre essas CL_{50} em torno de 1 é menor do que aquelas obtidas para cromo e amônia em bioensaios com *T. biminiensis*, sugerindo que esta espécie absorve o TBT mais rapidamente que o cromo e amônia. *T. biminiensis* foi menos sensível ao TBT relativamente a outras espécies de copépodos bentônicos. Entretanto, copépodos bentônicos são menos sensíveis ao TBT do que copépodos planctônicos. Nos bioensaios com sedimento, avaliou-se a toxicidade letal (CL_{50}) e sub-letal (CE_{50} , efeito sobre a fecundidade) do TBT em exposições de 96 h. Foi também avaliado o efeito da liofilização sobre estes parâmetros de toxicidade. A CL_{50} -96h média do TBT foi de 31 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido (p.u.), enquanto a CE_{50} -96h média sobre a fecundidade total foi de 5,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u. Os bioensaios revelaram que *T. biminiensis* é mais sensível ao TBT do que outros organismos (anfípodo, poliqueta e peixe). A CL_{50} -96h no sedimento se ajustou à predição feita a partir da teoria de equilíbrio de partição água-sedimento, sugerindo que o TBT atingiu equilíbrio dinâmico durante os bioensaios. A manipulação do sedimento através da liofilização aumentou a toxicidade aguda do mesmo quando comparado aos bioensaios com sedimento úmido. Por outro lado, houve uma atenuação na toxicidade aguda do sedimento liofilizado ao longo de 30 dias de estocagem em freezer. Apesar disso, a liofilização não teve efeito sobre a toxicidade sub-letal do sedimento. A liofilização foi vantajosa porque reduziu a variabilidade das CL_{50} -96h e isto pode ser resultado da eliminação de micro-gradientes físico-químicos no sedimento. Como desvantagem da liofilização, destaca-se a eliminação dos micro-gradientes físico-químicos do sedimento, que pode dificultar a caracterização da toxicidade *in situ* de amostras coletadas no campo. Novos estudos devem considerar o efeito da liofilização sobre amostras fortificadas com metais e outros contaminantes orgânicos a fim de melhor avaliar essa técnica de manipulação.

Palavras-chave: Tributilestanho; Toxicidade; Revisão; Água; Sedimento

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is very toxic for marine organisms and has been reported as an endocrine disruptor for mollusks and crustaceans. This study reviews TBT acute toxicity for crustaceans and assesses TBT toxicity in water and sediment for the marine copepod *Tisbe biminiensis*. Review of TBT toxicity was carried out using data extracted from the *Pesticide Action Network* (PAN) database. Data were grouped according to taxonomic, experimental and chemical criteria. The reviewed information indicates that copepod species are the most sensitive to TBT. There are no significant differences between LC₅₀ calculated from static, renewal and flow-through tests. There is also no difference in toxicity between the most frequently chemicals used in bioassays: tributyltin oxide, fluoride and chloride. TBT acute toxicity in water for ovigerous females of *T. biminiensis* was evaluated during exposures of 48 h. Average 24 h and 48 h LC₅₀ were 37 and 36 µg TBT L⁻¹, respectively. The 24h/48h LC₅₀ ratio around 1.0 is lower than those obtained for chromium and ammonia in bioassays with *T. biminiensis*, suggesting that this species absorbs TBT faster than chromium and ammonia. *T. biminiensis* is less sensitive to TBT when compared to other benthic copepods. However, benthic copepods are less sensitive to TBT than planktonic copepods. Lethal (LC₅₀) and sublethal (EC₅₀ on fecundity) effects of TBT on *T. biminiensis* were assessed in sediment bioassays with exposures of 96 h. The average 96h LC₅₀ and EC₅₀ were 31 and 5.2 µg TBT g⁻¹ wet weight (ww), respectively. Based on the results, *T. biminiensis* is more sensitive to TBT than other benthic organisms, including amphipod, polychaete and fish. The 96 h LC₅₀ was consistent with the equilibrium partitioning theory, suggesting that TBT reached sediment-pore water steady state in the bioassays. Freeze-drying was also evaluated as a method for preparing samples prior to sediment bioassays. Freeze-dried samples were more toxic, exhibiting a 96 h LC₅₀ of 20 µg TBT g⁻¹ ww. However, toxicity of freeze-dried sediment was reduced over 30 days of storage at -20 °C. Interestingly, freeze-drying did not affect sublethal toxicity of sediment samples. It also reduced variability of 96 h LC₅₀ across replicate bioassays. This may be a consequence of improved sample homogenization since freeze-drying tends to eliminate microphysical-chemical gradients in sediment. The artifact generated by freeze-drying is not suitable for characterizing the *in situ* sediment toxicity. Further studies with metals and other organic chemicals should be carried out for evaluating freeze-drying as a technique for preparing sediments prior to toxicity tests.

Keywords: Tributyltin; Toxicity; Review; Water; Sediment.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELA.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
LISTA DE ANEXOS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Poluição marinha e a ecotoxicologia	1
1.2 Percepção da poluição marinha por tributilestanho	3
1.3 A problemática das tintas anti-incrustantes	3
1.4 O destino do TBT no ambiente marinho	6
1.5 Modelos biológicos para avaliação da toxicidade do TBT	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. CAPÍTULO 1.....	14
3.1 RESUMO	15
3.2 INTRODUÇÃO	15
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.3.1 Revisão da toxicidade aguda para crustáceos.....	17
3.3.2 Análise estatística da CL ₅₀ dos compostos de tributilestanho	17
3.4 RESULTADOS.....	18
3.4.1 Propriedades físico-químicas e fatores de bioconcentração do TBT	18
3.4.2 Agrupamento pela taxonomia do subfilo Crustacea e pelo ambiente.....	20
3.4.3 Agrupamento por tipo de teste e tempo de avaliação.....	22

3.4.4	Agrupamento por composto de tributilestanho.....	25
3.5	DISCUSSÃO	26
4.	CAPÍTULO 2.....	32
4.1	RESUMO	33
4.2	INTRODUÇÃO	33
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.3.1	Cultivo do organismo modelo.....	35
4.3.2	Preparo das soluções.....	35
4.3.3	Bioensaio com <i>T. biminiensis</i>	36
4.3.4	Análise dos dados.....	38
4.3.4.1	Cálculo e comparação das CL_{50}	38
4.3.4.2	Cálculo da CENO e CEO	39
4.4	RESULTADOS.....	39
4.4.1	Registro da CL_{50} para <i>Tisbe biminiensis</i>	39
4.5	DISCUSSÃO	42
5.	CAPÍTULO 3.....	49
5.1	RESUMO	50
5.2	INTRODUÇÃO	50
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
5.3.1	Coleta do sedimento.....	52
5.3.2	Preparo das soluções de TBT e fortificação da fração lamosa.....	52
5.3.3	Determinação do peso seco e teor orgânico do sedimento.....	54
5.3.4	Efeito da liofilização sobre a toxicidade da fração lamosa.....	55
5.3.5	Bioensaio com <i>T. biminiensis</i>	55
5.3.6	Análise dos dados.....	56
5.4	RESULTADOS.....	57

5.4.1	Caracterização e efeito letal do TBT adsorvido à fração lamosa úmida	57
5.4.2	Efeito sub-letal do TBT adsorvido à fração lamosa úmida	59
5.4.3	Efeito letal do TBT adsorvido à fração lamosa liofilizada e estocada	61
5.4.4	Efeito sub-letal do TBT adsorvido à fração lamosa liofilizada	63
5.5	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES GERAIS	76
7.	PERSPECTIVAS	77
8.	REFERÊNCIAS	77
9.	ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Poluição marinha e a ecotoxicologia

Poluição marinha é o aporte antropogênico para o ambiente marinho de substâncias ou energia que produzem efeitos deletérios sobre os recursos vivos e a saúde humana, restringindo as possibilidades de uso pelo homem (GESAMP, 1982). Esta definição associou o aporte de substâncias antropogênicas a efeitos deletérios sobre a biota e tem sido o fundamento de normas internacionais que protegem o ambiente marinho. Baseado nesta definição, o *Grupo de Especialistas em Aspectos Científicos da Poluição Marinha* (GESAMP, em inglês) produziu nas últimas décadas relatórios sobre a qualidade do ambiente marinho, compilando os registros científicos da poluição marinha e transformando-os em alerta para a sociedade (GESAMP, 2002).

O contexto moderno da poluição marinha inclui 16 categorias de substâncias (Tab. 1) potencialmente prejudiciais e lista como fontes desta contaminação o aporte atmosférico, fontes baseadas no continente e relacionadas à navegação (GESAMP, 2009). Nestas categorias estão incluídas cerca de 100.000 substâncias químicas de uso rotineiro cujos efeitos sobre a biota precisam ser conhecidos. Para caracterizar o potencial tóxico de um composto é necessário conhecer suas propriedades físico-químicas e quantificar seu efeito sobre a biota (e.g., quantos indivíduos morrem após exposição ao composto).

Tabela 1 – Categorias de contaminantes liberados no ambiente marinho. Adaptado de GESAMP (2009). **COV:** compostos orgânicos voláteis; **POP:** poluentes orgânicos persistentes; **HPA:** hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Categoria	Exemplo	Vetor
Água de lastro		Navegação
CO ₂ ; SO ₂		Atmosfera, Navegação
COVs	Aldeídos, Cetonas, Hidrocarbonetos (C ₂ -C ₇)	Atmosfera, Navegação
Resíduos lançados		Navegação
Esgoto		Navegação, Fontes terrestres
HPAs	Benzo(a)pireno, fluoranteno	Atmosfera, Navegação, Fontes terrestres
Lixo	Plástico	Fontes terrestres, Navegação
Metais pesados	Hg, Pb, Cd, As, Ni, Cu	Atmosfera, Navegação, Fontes terrestres
NO _x		Navegação
Nutrientes	Fe, N, P, Zn, Co	Atmosfera, Fontes terrestres
Óleo	Vazamentos, Naufrágios	Navegação
Partículas		Navegação
POPs	DDT, Dieldrin	Atmosfera
Outros	Derrames acidentais e Exploração	Navegação
Ruído		Navegação, Exploração, Atividades Bélicas

Segundo Jørgensen (1997), a completa caracterização de um composto deve considerar pelo menos 25 propriedades físico-químicas (e.g., solubilidade e coeficientes de partição). Para avaliar sua toxicidade sobre a biota, devem ser quantificados os efeitos sobre pelo menos 10 parâmetros biológicos (e.g. taxa de absorção do poluente e efeitos subletais) de 25.000 espécies representativas da biodiversidade global (JØRGENSEN, 1997). Jørgensen (1997) estimou que seria necessário obter aproximadamente 25 bilhões de dados para descrever o potencial tóxico das substâncias de uso rotineiro. A comunidade científica começou a gerar este conhecimento agrupando substâncias com propriedades físico-químicas similares e predizendo a toxicidade destas substâncias conforme suas propriedades (BIANCHINI *et al.*, 2003).

Na busca pelo conhecimento sobre os efeitos da poluição, emergiu na década de 1970 o ramo da ciência intitulado “ecotoxicologia” (TRUHAUT, 1977). Este autor definiu ecotoxicologia como “*o ramo da toxicologia preocupado com os efeitos tóxicos, causados por poluentes sintéticos ou naturais, para os constituintes dos ecossistemas, em um contexto integral*”. Este ramo da ciência integra princípios da toxicologia e da ecologia e objetiva rastrear o destino de poluentes liberados no ambiente e seus efeitos sobre a biota (CHAPMAN, 2002). A avaliação destes efeitos inclui informações sobre vias de absorção do poluente, sua distribuição nos tecidos dos organismos, mecanismos biológicos para processamento e excreção de poluentes e quantificação dos efeitos sobre diferentes níveis de organização biológica (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da ecotoxicologia permitiu a compreensão de declínios populacionais e o estabelecimento de uma relação causal entre poluentes e seus efeitos sobre a biota. Dessa forma, os declínios de populações silvestres (COLBORN *et al.*, 2002), os efeitos nefastos do DDT compilados no clássico livro Primavera Silenciosa (CARLSON, 1962) e tragédias sociais como a de Minamata (SAKAMOTO *et al.*, 2010) foram compreendidos.

Na abordagem ecotoxicológica, a compreensão dos impactos dos poluentes integra três questões importantes: 1) observação dos efeitos deletérios em populações silvestres; 2) identificação da substância causadora deste efeito; e 3) o estabelecimento da relação dose-efeito para a substância em questão (TRUHAUT, 1977). Esta sequência de obtenção de informações será descrita na introdução do presente trabalho para o tributilestano, que emergiu como poluente no final do século XX, com evidências de efeitos que se acumularam ao longo dos anos e foram corroboradas pelo estabelecimento da relação dose-resposta (SMITH, 1981; MORA, 1996; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010).

1.2 Percepção da poluição marinha por tributilestanho

Na década de 1970 um estranho declínio na produção de ostras começou a ser observado na baía de Arcachon, situada na costa sudoeste da França. Nesta região havia se desenvolvido uma robusta atividade de maricultura, com estimativas de produção de moluscos variando de 10 a 15 ton ha⁻¹ ano⁻¹ (ALZIEU, 1991). Em 1971 a espécie de ostra *Crassostrea gigas* foi introduzida na baía, cujas condições favoreceram seu rápido crescimento populacional. Por conta destas condições, a baía de Arcachon rapidamente se constituiu em centro fornecedor de juvenis de ostra para as demais regiões da França (HIS e ROBERT, 1985).

O declínio na produção começou a ser observado em 1977, diminuindo drasticamente o fornecimento de juvenis da baía de Arcachon e, em 5 anos, provocou um prejuízo de 880 milhões de francos (140 milhões de dólares) (ALZIEU, 1991). Concomitante à redução na produção de juvenis, observaram-se anomalias na calcificação das carapaças das ostras e atrasos no desenvolvimento das mesmas (ALZIEU, 2000a). Estas anomalias não foram observadas em regiões vizinhas à baía de Arcachon e algumas hipóteses foram estabelecidas na tentativa de explicá-las: (1) as anomalias estariam relacionadas a variações na fecundidade dos reprodutores; (2) variações na temperatura das águas da baía explicariam as anormalidades; (3) as anomalias estariam relacionadas a problemas na alimentação larval; (4) a poluição na região seria a responsável pelas anomalias (HIS e ROBERT, 1985; ALZIEU, 1991).

No início da década de 1980, os resultados reportados por ALZIEU *et al.* (1980; 1982) falsearam as três hipóteses iniciais e sugeriram que as anomalias estavam relacionadas ao uso de tintas anti-incrustantes aplicadas em embarcações. Na região da baía de Arcachon havia se desenvolvido uma intensa atividade náutica e foi encontrada forte correlação entre a frequência das anomalias e o número de embarcações (ALZIEU *et al.*, 1980; ALZIEU, 1991). ALZIEU *et al.* (1982) sugeriram que compostos de tributilestanho (TBT) seriam os responsáveis pelas anomalias, pois em experimentos de laboratório estes compostos provocavam os mesmos efeitos observados na baía. A relação dose-resposta entre o tributilestanho e as anomalias em *C. gigas* foi corroborada pelos resultados encontrados por WALDOCK *et al.* (1983), HIS e ROBERT (1985) e CHAGOT *et al.* (1990).

1.3 A problemática das tintas anti-incrustantes

O desastre ambiental ocorrido na baía de Arcachon e as pesquisas subseqüentes expuseram a problemática da poluição pelo tributilestanho relacionando-a com fontes difusas encontradas na baía. Os prejuízos econômicos forçaram o governo da França, a partir

de 1982, a regular o uso de tintas anti-incrustantes à base de tributilestanho (ALZIEU, 1991) e estimularam a pesquisa em torno do potencial poluidor destes compostos.

O estímulo às pesquisas em torno do tributilestanho pode ser percebido a partir da década de 1970, período no qual houve um aumento expressivo nos trabalhos científicos publicados sobre este poluente. Uma pesquisa na base *Scopus* com o termo “tributyltin” registra apenas 43 trabalhos publicados entre 1957 e 1971, relacionados principalmente à síntese destes compostos (ELSEVIER, 2012). Entre 1972 e 2000, contudo, estão registrados cerca de 2600 trabalhos, com uma mudança qualitativa no objetivo dos mesmos, os quais foram predominantemente na área de ciências ambientais (ELSEVIER, 2012).

Os compostos orgânicos de estanho são categorizados como moléculas organoestânicas. Estas moléculas possuem átomos de Sn ligados a grupos orgânicos alquila ou arila e grupos aniônicos (MANAHAN, 2005). Elas podem ser representadas pela fórmula geral R_nSnX_{4-n} , onde R representa os grupos orgânicos e X a espécie aniônica (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). Nos grupos alquila, o estanho liga-se a cadeias abertas saturadas representadas pela fórmula C_xH_{2x+1} (e.g., óxido de (bis)tributilestanho, $((C_4H_9)_3Sn)_2O$). Nos grupos arila, entretanto, o estanho liga-se a anéis aromáticos (e.g., cloreto de trifenilestanho, $(C_6H_5)_3SnCl$).

A síntese em laboratório das moléculas organoestânicas se iniciou em 1849, quando Frankland produziu o diiodeto de dietilestanho $((C_2H_5)_2SnI_2)$ (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). A aplicação em escala industrial das mesmas, contudo, ocorreu apenas no século XX, em dois momentos diferentes. O primeiro momento se iniciou em 1936, quando o composto dilaurato de dibutilestanho foi utilizado para estabilização do cloreto de polivinila (PVC) contra ação da luz e do calor e como catalisador de reações químicas (MULLER *et al.*, 1989; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). Posteriormente, compostos organoestânicos foram utilizados como estabilizadores em borrachas, nylon, hidrocarbonetos clorados, peróxido de hidrogênio e óleos lubrificantes (PIVER, 1973). No segundo momento, a partir da década de 1960, os compostos organoestânicos começaram a ser utilizados como biocidas. Estes compostos foram aplicados como microbiocidas, fungicidas, moluscicidas e anti-incrustantes (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010; KEGLEY *et al.*, 2011).

A produção mundial de organoestânicos cresceu exponencialmente ao longo dos anos, sendo estimada em 500 ton em 1950 (SNOEIJ *et al.*, 1987), 28.000 ton em 1976 (WHO, 1990) e pode ter alcançado 50.000 ton em 1986 (FENT, 1996). FENT (1996) destacou que 23% da produção de organoestânicos foram usadas como agroquímicos e biocidas em geral, contudo neste montante destacam-se os compostos de tributilestanho por serem os mais tóxicos. O primeiro registro das propriedades biocidas do tributilestanho foi feito na segunda metade da década de 1950 e este registro norteou as futuras aplicações destes compostos (YEBRA *et al.*, 2004).

A primeira aplicação dos compostos de tributilestanho como biocidas ocorreu no continente africano, como moluscicidas contra caramujos de água doce vetores da esquistossomose (WHO, 1990). Este uso motivou a aplicação do tributilestanho como

princípio ativo de tintas para evitar a incrustação biológica em embarcações. A partir da década de 1960 os compostos de tributilestanho foram aplicados como biocidas anti-incrustantes em barcos, navios, cais, gaiolas de peixes e em sistemas de refrigeração de usinas de geração de energia (WHO, 1990).

A bioincrustação foi definida por KIRSCHNER e BRENNAN (2012) como o recobrimento de superfícies submersas no oceano por moléculas orgânicas e por organismos marinhos. Este processo ocorre sequencialmente a partir da adsorção das moléculas orgânicas à superfície, que inicia a sucessão ecológica de bactérias até organismos da macrofauna (YEBRA *et al.*, 2004). O intervalo até o estabelecimento da macrofauna pode variar de 2 a 3 semanas e ao longo deste processo os organismos se adensam na superfície tornando-a rugosa (KIRSCHNER e BRENNAN, 2012). A escala de rugosidade varia de micro-rugosidade, atribuída à adsorção de matéria orgânica, a macro-rugosidade, relacionada à incrustação por algas e animais (IMC, 2004).

Os impactos econômicos da bioincrustação têm sido avaliados sob as perspectivas da aquicultura (FITRIDGE *et al.*, 2012) e da indústria naval (SCHULTZ *et al.*, 2011). Segundo FITRIDGE *et al.* (2012), os custos para combater a bioincrustação na aquicultura variam de 1,5 a 3 bilhões de dólares por ano e na indústria naval os custos acumulados em 15 anos (2009-2024) poderiam alcançar 2,2 bilhões de dólares (SCHULTZ *et al.*, 2011). A discriminação dos prejuízos da bioincrustação no casco de um navio inclui (1) maior consumo de combustível devido ao aumento no arrasto do navio, (2) aumento na frequência da docagem para remoção dos organismos incrustantes do casco e novas pinturas do navio, e (3) velocidade de cruzeiro reduzida e maior tempo para os deslocamentos (IMC, 2004; SCHULTZ *et al.*, 2011). Ante estes custos, torna-se essencial o desenvolvimento de tecnologias que combatam a bioincrustação.

As estratégias para combater a incrustação em superfícies submersas podem ser agrupadas sob a designação de sistemas anti-incrustantes (SAI). A Organização Marítima Internacional (IMO, em inglês) define tais sistemas como qualquer tratamento, físico ou químico, capaz de controlar ou impedir a bioincrustação (IMO, 2001). A eficiência dos SAI pode ser avaliada pelos seguintes parâmetros: (1) toxicidade para vários organismos incrustantes; (2) insolubilidade em água e baixa persistência no ambiente; (3) baixa toxicidade para mamíferos e ausência de biomagnificação na cadeia alimentar; e (4) compatibilidade com os demais compostos da tinta e boa relação custo/benefício (IMO, 1999).

Os SAI evoluíram juntamente com a navegação. Nas primeiras tentativas para combater a bioincrustação, que remontam às culturas antigas, os cascos dos navios foram revestidos com cera, alcatrão e até mesmo revestimento com chumbo e cobre (YEBRA *et al.*, 2004). Até o final do século XVIII houve uso intenso do cobre, chumbo e ferro para revestimento dos cascos, contudo, havia a desvantagem da corrosão destes metais sob ação da água do mar (YEBRA *et al.*, 2004). YEBRA *et al.* (2004) reportam que no século XIX começaram a ser utilizadas as tintas, nas quais metais (e.g., óxidos de mercúrio e zinco) estavam dispersos

em matriz orgânica. Com a evolução destes SAI houve uma diminuição na bioincrustação dos cascos e o intervalo entre as docagens dos navios aumentou.

Na década de 1960, a introdução dos compostos de TBT aos sistemas anti-incrustantes pareceu solucionar definitivamente o problema da bioincrustação em navios. Inicialmente, os compostos de TBT agiam como co-tóxicos nos SAI, contudo, gradualmente o TBT se tornou o princípio ativo das tintas (YEBRA *et al.*, 2004). Em 2001 foi estimado que entre 70-80% dos navios da frota comercial global, correspondendo entre 56.000 e 64.000 navios, continham SAI à base de TBT (CHAMP, 2001). Os navios com SAI a base de TBT tornaram-se fontes difusas para poluição do ambiente marinho pelos compostos de TBT.

No final da década de 1980, novos SAI conhecidos como biocidas intensificadores (ou, em inglês, *booster biocides*) começaram a ser aplicados aos cascos dos navios. Estes SAI consistem de biocidas orgânicos combinados com óxidos de cobre e são conhecidos como “livres de TBT” (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004). Atualmente existem 18 compostos utilizados como biocidas intensificadores, entre os quais os herbicidas diuron e irgarol (THOMAS, 2001). A aplicação dos biocidas intensificadores já qualificou estes compostos como contaminantes no ambiente marinho (KONSTANTINOU e ALBANIS, 2004) e estimulou a avaliação da toxicidade dos mesmos (KARLSSON *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011a).

1.4 O destino do TBT no ambiente marinho

O aporte difuso do TBT para o ambiente marinho tornou-se problemático devido às propriedades físico-químicas dos mesmos. Para se avaliar o destino do TBT no ambiente marinho estas propriedades devem ser consideradas juntamente com parâmetros abióticos da água. Esta junção de informações definirá se, após o aporte, o TBT será degradado e quais as vias de degradação. Também definirá se será absorvido pela biota ou adsorvido ao material particulado em suspensão na água.

Na molécula do tributilestanho, o átomo de C liga-se covalentemente ao átomo de Sn. Esta ligação confere à molécula de TBT estabilidade na presença da água, de O₂ atmosférico e de calor (HOCH, 2001). No processo de degradação da molécula de TBT, os radicais butil são progressivamente removidos pela quebra da ligação Sn–C, originando novas moléculas (dibutilestanho, monobutilestanho e estanho inorgânico). Este processo de degradação pode ocorrer sob influência de três fatores: 1) radiação (luz visível, ultravioleta e gama), 2) processos biológicos e 3) processos químicos (RADKE *et al.*, 2008). A contribuição de cada um destes fatores varia principalmente com o ambiente marinho (costeiro ou oceano aberto) e a profundidade da coluna d'água.

A degradação da molécula de TBT através da hidrólise e de variações no pH foi avaliada em água destilada. Os resultados reportados pela WHO (1990) indicam que,

considerando-se apenas estes fatores, as concentrações de TBT na água podem permanecer estáveis por até 11 meses. No ambiente marinho, contudo, o pH controla a especiação do TBT e pode alterar significativamente as taxas de bioconcentração pelos organismos (FENT e LOOSER, 1995; RADKE *et al.*, 2008). A fotólise tem sido considerada a rota mais rápida para degradação do TBT na água, pois a energia de 300 kJ mol^{-1} associada à radiação ultravioleta supera a energia de dissociação (entre 190 e 220 kJ mol^{-1}) da ligação Sn–C (HOCH, 2001).

A biodegradação das moléculas de TBT tem se mostrado eficiente em sedimentos estuarinos (DOWSON *et al.*, 1996) e na água (SELIGMAN *et al.*, 1988). Nesta última, entretanto, a biodegradação ocorre mais rapidamente que no sedimento (HARINO *et al.*, 1997). A biodegradação de TBT por microalgas se mostrou eficiente pela espécie de clorofícea *Chlorella* sp. (TSANG *et al.*, 1999), com degradação de 40%, e pela diatomácea *Skeletonema costatum* (READER e PELLETIER, 1992). Devem ser considerados também nas estratégias de biodegradação todos os mecanismos de detoxificação encontrados em organismos marinhos e a adsorção destes compostos à superfície de organismos planctônicos. GADD (2000) estimou que 95% do TBT na coluna d'água se adsorve ao material particulado, e isto realça o “bombeamento biológico” para o fundo marinho em regiões com alta densidade de organismos planctônicos.

A consideração de todas essas vias de remoção do TBT da coluna d'água permite estimar a meia-vida ($t_{1/2}$) para esta molécula no ambiente marinho. As estimativas da $t_{1/2}$ do TBT na água do mar variam de poucos dias a semanas, classificando a persistência do TBT na água como de baixa a moderada (BENSON, 1999). Numa escala global, estas estimativas podem variar significativamente entre as latitudes, correlacionando-se com os gradientes de insolação e temperatura, produtividade biológica e, regionalmente, com variações sazonais (MAGUIRE, 2000). As análises do TBT no ambiente marinho devem ser inseridas nesta complexa cadeia de processos físicos, químicos e biológicos que determinarão a concentração final deste contaminante no ambiente.

O estanho e os compostos organoestânicos não são completamente estranhos ao ambiente marinho. Nas águas oceânicas, o estanho está presente principalmente como $\text{SnO}(\text{OH}_3)^-$ com concentrações entre 0,003 e $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$, contudo em águas costeiras estas concentrações podem aumentar de 10 a 100 vezes pelo aporte antropogênico (KENNISH, 1997). No leito oceânico, o estanho está presente como mineral cassiterita (SnO_2) em depósitos aluviais (GESAMP, 1977). Os compostos organoestânicos podem ser produzidos a partir da biometilação de estanho inorgânico pela microflora de sedimentos estuarinos (GUARD *et al.*, 1981; HALLAS *et al.*, 1982) e em águas naturais (BRAMAN e TOMPKINS, 1979).

As concentrações de TBT na água do mar começaram a ser quantificadas na década de 1980 juntamente com a frequência das anomalias em populações de ostras. As concentrações foram comparadas com o limite de 20 ng L^{-1} estabelecido por HIS e ROBERTS (1985) como seguro para ostras. Acima deste limite, HIS e ROBERT (1985)

reportaram distúrbios no desenvolvimento embriônico e larval de *C. gigas* até a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na baía de Arcachon, ALZIEU *et al.* (1986) reportaram concentrações variando de < 150 a 900 ng L^{-1} entre 1982 e 1985, iniciando, a partir deste trabalho monitoramentos em grande escala. Entre 1986 e 1987, amostras de água de toda a costa Atlântica da França foram analisadas, apresentando concentrações variando de < 2 a 1.500 ng L^{-1} (ALZIEU *et al.*, 1989). Em 1988, o Programa de Monitoramento da Poluição no Mediterrâneo (MED POL) financiou as análises de TBT em amostra de água do Mediterrâneo, cujas concentrações variaram de < 2 a 12.150 ng L^{-1} (GABRIELIDES *et al.*, 1990; ALZIEU *et al.*, 1991). Estes registros expuseram a problemática da poluição por TBT, contudo, os programas de monitoramento do TBT se concentraram em países desenvolvidos, como no Canadá (MAGUIRE *et al.*, 1986) e na Inglaterra (EBDON *et al.*, 1988).

Na década de 1990 foram aperfeiçoados os métodos analíticos para extração de TBT em matrizes biológicas ricas em lipídeo (KANNAN e TANABE, 2009) e isto permitiu ampla utilização de espécies marinhas como biomonitores da poluição por TBT. Neste período, destacam-se o *Mussel Watch Program*, que revelou generalizada contaminação por TBT na região costeira dos Estados Unidos (UHLER *et al.*, 1993) e de países asiáticos (SUDARYANTO *et al.*, 2000). YAMADA *et al.* (1997) utilizaram 77 amostras de lulas obtidas em todo o globo para traçar a poluição por TBT em águas costeiras e oceânicas. As concentrações de TBT em lulas coletadas nas águas costeiras variaram de não detectado (nd) a 279 ng g^{-1} , enquanto que, em lulas oceânicas a variação foi de nd a 8 ng g^{-1} . Para o hemisfério norte, a variação nas concentrações foi de 2 a 279 ng g^{-1} , enquanto no hemisfério sul a variação foi de nd a 18 ng g^{-1} . A diferença entre os hemisférios para as concentrações de TBT foi cerca de 280 vezes, enquanto que para as bifenilas policloradas (PCB) esta diferença foi de 62 vezes. A generalizada contaminação do ambiente marinho por TBT foi corroborada pelas análises em tecidos de aves (GURUGE *et al.*, 1997) e mamíferos marinhos (TANABE, 1999).

Devido às características hidrofóbicas, o TBT rapidamente se particiona para a fase particulada na água do mar (K_d , coeficiente de distribuição partícula-água). A deposição do material em suspensão transforma os sedimentos no maior reservatório de TBT no ambiente marinho (BURTON *et al.*, 2002). LANGSTON e POPE (1995) avaliaram esta partição e reportaram que em menos de 2 h o equilíbrio entre as fases particulada e dissolvida foi alcançado, com 86% do TBT adsorvido ao material particulado. Em estuários, entre 57 e 95% do TBT pode estar adsorvido à fase particulada (RANDALL e WEBER, 1986). RANDALL e WEBER (1986) reportaram ainda que a eficiência desta partição variou de 0 a 100% sendo maior para o monobutilestanho e menor para o dibutilestanho.

Os parâmetros físico-químicos da água (e.g., pH e salinidade) e do sedimento (e.g., mineralogia, percentual orgânico) governam o K_d do TBT (HOCH *et al.*, 2002). HOCH *et al.* (2002) reportaram maiores valores para o $\log K_d$ na faixa de pH entre 6 e 7 (2,17 e 2,21 L kg^{-1} , respectivamente) e, em pH 8, o $\log K_d$ médio foi 1,7 L kg^{-1} . A variação do K_d em pH 8

esteve relacionada a diferenças na composição mineralógica do sedimento (ilita, caolinita montmorillonita). A desorção do TBT do material particulado é governada pela interação desses fatores e HOCH *et al.* (2002) reportaram a desorção percentual variando de 23 a 35%. O balanço entre as taxas de adsorção e desorção do TBT à fase particulada determinarão se os sedimentos agirão como sumidouro ou fonte de TBT para a coluna d'água (BURTON *et al.*, 2002).

A persistência do TBT no sedimento varia em função das taxas de degradação. Estimativas da meia-vida do TBT em sedimentos marinhos variam de 1 a 15 anos, classificando o TBT como moderadamente persistente (MAGUIRE, 2000). Nos sedimentos, a principal via de degradação é a debutilação pela microbiota (DOWSON *et al.*, 1996) e pode ser quantificada através do índice de degradação de butilestanho (IDB) (DÍEZ *et al.*, 2002). O IDB é a razão entre a soma das concentrações das espécies mono e dibutilestanho sobre a concentração do TBT. Se a razão for menor que 1 indica um aporte recente de TBT no ambiente.

As concentrações de TBT no sedimento de diferentes regiões estão reportadas na Tabela 2. Concentrações tão elevadas quanto 340000 $\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ foram reportadas em sedimentos da Grande Barreira de Corais (NEGRI e MARSHALL, 2009) e regionalmente refletem a presença de portos, aportes de esgotos domésticos e legislações que regulam o uso dos compostos de TBT. No Brasil, foram reportadas concentrações de TBT variando de nd a 2796 $\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ (Tabela 2). Os efeitos do TBT adsorvido ao sedimento sobre comunidades bentônicas incluem redução na riqueza, diversidade e biomassa de espécies na meiofauna e macrofauna (AUSTEN e MCEVOY, 1997; DAHLLOF *et al.*, 2001) e redução na atividade fotossintética de gramíneas marinhas (JENSEN *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Concentrações recentes de tributilestanho (TBT) no sedimento ($\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ peso seco) registradas em diferentes regiões.

	Local	Amostragem	Concentrações ($\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ p.s.)	Referência
Brasil	Baía de Guanabara	2001	14 - 82	Almeida et al. (2004)
	Baía de Guanabara	2000	10 - 521	Fernandez et al. (2005)
	Baía de Todos os Santos	2003	nd - 15	Felizzola et al. (2008)
	Baía de Todos os Santos	2003-2004	nd - 438	Pletsch et al. (2010)
	Costa de São Paulo	1998	17 - 847	Godoi et al. (2003)
	Costa de Santa Catarina	2007-2008	nd - 1136	Oliveira et al. (2010)
	Complexo Estuarino de Paranaguá	2006	nd - 2796	Santos et al. (2009)
Equador	Golfo de Guayaquil	2009	13-99	Castro et al. (2009)
Taiwan	Ilha Hsiao Liouchiou		3.96 - 765	Liu et al. (2011)
Espanha	Estuário de Gipuzkoa	2000	50 - 5480	Arambarri et al. (2003)
Espanha	Costa Mediterrânea	1995; 1999-2000	124 - 18722	Diez et al. (2002)
Polônia	Porto de Gdynia	2009	1717 - 6743	Radke et al. (2012)
China	Hong Kong		< 0,04 - 224	Cheung et al. (2003)
Península Ibérica	Costa Atlântica e Mar Mediterrâneo	1995-2003	<1,5 - 3069	Diez e Bayona (2009)
Portugal	Canion Nazaré	2005-2006	< 0,1 - 470	Sousa et al. (2012)
Austrália	Grande Barreira de Corais	2000	< 1 - 340000	Negri e Marshall (2009)
Antártica	Mar de Ross	2002	< 20 - 2290	Negri e Marshall (2009)

Nota – Amostragem: ano de coleta das amostras; **nd:** não detectado.

No Brasil, os efeitos da poluição por TBT nas regiões costeiras datam do início do século XXI e utilizaram como modelo o neogastropode *Stramonita haemastoma*, que se mostrou um bioindicador sensível (LIMAVERDE *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2008). O parâmetro avaliado nas populações silvestres deste molusco tem sido a frequência de fêmeas com caracteres masculinos tal como pênis e/ou vaso deferente, fenômeno conhecido como imposex (FERNANDEZ *et al.*, 2007). Este parâmetro tem sido correlacionado com as concentrações de TBT nos sedimentos de regiões costeiras do Brasil, nas quais estão instalados portos e/ou marinas com intensa movimentação de embarcações (FERNANDEZ *et al.*, 2005; TOSTE *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2012a; CASTRO *et al.*, 2012b). Em Arraial do Cabo, no Estado do Rio de Janeiro, TOSTE *et al.* (2011) reportaram aumento na incidência de imposex após o estabelecimento da Norma da Autoridade Marítima do Brasil (NORMAM), que regulou a aplicação do TBT (NORMAM, 2007). A elevada frequência de imposex sugere ineficácia no cumprimento da legislação.

Ante as evidências da contaminação generalizada por TBT e os efeitos biológicos associados, a IMO coordenou um esforço global para regulamentar a utilização de SAI danosos, à base de TBT, em navios. A convenção proposta em 2001 pela IMO, intitulada “*International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships*”, requereu das partes a proibição do uso dos SAI à base de TBT em seus navios (IMO, 2001). As metas estabelecidas nesta convenção foram proibir a aplicação ou reaplicação dos SAI à base de TBT em navios até 2003 e proibir a presença de tais sistemas nos cascos dos navios até 2008. As metas revelaram a urgência em combater a poluição por TBT, contudo a adesão das partes à convenção foi bastante lenta.

O artigo 18 da convenção acima citada condicionou a entrada em vigor da mesma à ratificação por parte de 25 Estados que representassem 25% da navegação mercante mundial. Esta condicionante postergou até 2007 a entrada em vigor da convenção, quando o Panamá tornou-se Estado parte, representando-se 38,1% da navegação mundial (SENDÁ, 2009). Oficialmente a convenção entrou em vigor em 17 de setembro de 2008 e 63 países tornaram-se parte da mesma, representando 81% da frota mercantil (IMO, 2012). O governo brasileiro aprovou a convenção através do Decreto Legislativo nº 797/2010, que entrou em vigor apenas em 20/05/2012. Antes deste decreto, a única proibição quanto à utilização de SAI danosos em embarcações consistiu na Norma da Marinha do Brasil (NORMAM) que regulou a aplicação dos mesmos (NORMAM, 2007). A convenção da IMO não se aplica, entretanto, a navios de guerra, embarcações utilizadas sem fins comerciais pelos Estados parte, estruturas utilizadas na aquicultura e aos demais usos de TBT como biocida (IMO, 2001; FITRIDGE *et al.*, 2012). Dessa forma, o aporte de TBT para o ambiente marinho pode continuar no presente.

1.5 Modelos biológicos para avaliação da toxicidade do TBT

Os moluscos são os modelos mais amplamente utilizados em testes ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade do TBT. Estes são bioindicadores utilizados em programas de monitoramento da poluição por TBT no ambiente marinho, pois têm hábito sedentário, são abundantes e fáceis de coletar, apresentam elevados fatores de bioacumulação (LANGSTON e POPE, 2009) e são os modelos mais sensíveis a este poluente (ALZIEU, 2000b; EVANS e NICHOLSON, 2000). Devido aos prejuízos econômicos decorrentes do declínio de populações de moluscos, a primeira relação concentração de TBT versus efeito biológico foi estabelecida para espécies de moluscos (HIS e ROBERT, 1985).

Organismos planctônicos, que se deslocam passivamente com o movimento das massas de água, também têm sido utilizados para monitorar e avaliar a contaminação do ambiente marinho pelo TBT. Os organismos de hábito planctônico constituem a base da cadeia alimentar oceânica e podem acumular e transferir o TBT para níveis tróficos superiores (HOEKSTRA *et al.*, 2003). HARINO *et al.* (1999) reportaram a primeira evidência de acúmulo de organoestânicos em organismos planctônicos a partir de amostras coletadas no Porto de Osaka, Japão, entre 1989 e 1996. Segundo os autores, as concentrações dos organoestânicos (TBT, DBT, MBT e TPT) variaram de nd a $7 \mu\text{g g}^{-1}$ ps (peso seco), com predomínio do TBT ao longo dos 7 anos de monitoramento. A partir das concentrações de organoestânicos reportadas para o plâncton, HARINO *et al.* (1999) não identificaram uma tendência temporal, contrastando com a redução das concentrações de organoestânicos na água ao longo dos sete anos.

A toxicidade do TBT foi avaliada para diferentes organismos modelo do plâncton, como fitoplâncton (RUMAMPUK *et al.*, 2004), copépodos (BUSHONG *et al.*, 1990), rotíferos (COCHRANE *et al.*, 1991) e larvas de ouriço-do-mar e peixe (PINKNEY *et al.*, 1990; PERINA *et al.*, 2011). A avaliação da sensibilidade ao TBT de diferentes modelos deve levar em consideração fatores relacionados à ecologia da espécie e à operacionalização dos bioensaios em laboratório (CHAPMAN, 2002). Estes fatores podem ser complementados com informações prévias sobre a sensibilidade do organismo a diferentes poluentes.

A conjugação dos fatores acima mencionados destaca a utilização dos copépodos como modelos em testes de toxicidade. Copépodos (Classe: Copepoda, Filo: Crustacea) são microcrustáceos com diversidade estimada em mais de 7.500 espécies e são de importância fundamental na cadeia trófica oceânica, pois conectam os produtores primários a níveis tróficos superiores (TRUJILLO e THURMAN, 2011). Quanto ao hábito, podem ser planctônicos ou bentônicos, estes últimos vivendo associados ao substrato oceânico. Os copépodos bentônicos compõem a meiofauna, cujos organismos passam através de malha de $500 \mu\text{m}$ e ficam retidos em malha de $42 \mu\text{m}$, sendo o segundo grupo mais abundante nas comunidades meiobênticas (SOUZA-SANTOS *et al.*, 2004).

A classe Copepoda subdivide-se em sete ordens das quais a ordem Harpacticoida destaca-se por conter cerca de 1.500 espécies e ser ubíqua no ambiente marinho (COULL, 1977; DAHMS e QIAN, 2004). Os Harpacticoida são primariamente de vida livre e isto tem favorecido seus cultivos em laboratório para utilização como alimento vivo (DRILLET *et al.*, 2011). Altas densidades em laboratório têm sido reportadas para cultivos das espécies *Tisbe holothuriae* (STOTTRUP e NORSEKER, 1997) e *Tisbe biminiensis* (RIBEIRO e SOUZA-SANTOS, 2011). Além da otimização do cultivo de *T. biminiensis*, esta espécie tem se destacado como alimento vivo para *Litopenaeus vannamei* (LIMA e SOUZA-SANTOS, 2007) e *Artemia* sp. (LIMA e SOUZA-SANTOS, 2011) e para o cavalo-marinho *Hippocampus reidi* (WILLADINO *et al.*, 2012).

Os cultivos em laboratório das espécies de copépodos Harpacticoida, especialmente aquelas do gênero *Tisbe*, estimularam a utilização das mesmas como modelos em bioensaios de toxicidade. Além da importância ecológica, fatores como ampla distribuição geográfica, ciclo de vida curto, facilidade e resistência à manipulação e baixo custo para realização dos bioensaios tornaram as espécies de Harpacticoida modelos adequados para testes ecotoxicológicos (DIZ *et al.*, 2009). Dessa forma, as espécies de Harpacticoida têm sido utilizadas para avaliar o efeito de poluentes a nível molecular (LAURITANO *et al.*, 2012) e sobre parâmetros populacionais importantes como sobrevivência, fecundidade e taxas de crescimento (BECHMANN, 1994; 1999).

A sensibilidade dos copépodos ao TBT vem sendo registrada ao longo dos últimos 30 anos (LINDEN *et al.*, 1979; BUSHONG *et al.*, 1988; KUSK e PETERSEN, 1997; ARA *et al.*, 2010; KEGLEY *et al.*, 2011) e no presente trabalho será avaliada a sensibilidade de *T. biminiensis* ao TBT tanto na água quanto no sedimento, bem como uma revisão da toxicidade aguda deste contaminante para crustáceos.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a toxicidade do tributilestanho (TBT) dissolvido na água e adsorvido ao sedimento para o copépodo marinho *Tisbe biminiensis*.

2.2 *Objetivos específicos*

1. Revisar a toxicidade dos compostos de tributilestanho para as espécies de crustáceo bem como avaliar o efeito de fatores químicos, experimentais e biológicos sobre a variação da concentração letal a 50% dos organismos expostos em bioensaios (CL₅₀).
2. Avaliar a toxicidade aguda do TBT dissolvido na água para fêmeas ovígeras do copépodo *T. biminiensis*.
3. Avaliar a toxicidade letal e sub-letal do TBT adsorvido ao sedimento para o copépodo *T. biminiensis*.
4. Avaliar o efeito da liofilização do sedimento sobre a toxicidade letal e sub-letal do TBT adsorvido ao sedimento para *T. biminiensis*.

3. CAPÍTULO 1

REVISÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO TRIBUTILESTANHO PARA CRUSTÁCEOS

3.1 RESUMO

A revisão da toxicidade de um poluente é o primeiro passo na avaliação do seu risco ecológico. O objetivo deste capítulo é revisar a toxicidade aguda do TBT para crustáceos. A revisão foi realizada a partir de dados extraídos da base de dados da *Pesticide Action Network North America* (PANNA). Os dados foram agrupados por critérios taxonômicos (Classe e Ordem), experimentais (tipo de teste e tempo de avaliação) e químicos (composto de TBT). Para cada agrupamento calculou-se uma CL_{50} mediana. A revisão da toxicidade indicou que a Classe Copepoda foi mais sensível ao TBT relativamente às Classes Malacostraca e Branchiopoda. A Ordem Anostraca, representada pela espécie *Artemia salina*, foi a mais resistente ao TBT. Estas diferenças provavelmente estão relacionadas ao ciclo de vida, tamanho dos organismos, sistemas de detoxificação e ao balanço absorção/excreção do TBT pelas diferentes espécies. Não houve diferenças significativas entre testes estático, semi-estático e de fluxo contínuo. Isto pode estar relacionado à estabilidade do TBT, contudo o tipo de teste deve ser escolhido com cautela. Foi possível modelar a redução na CL_{50} mediana para copépodos e cladóceros, estimando-se a concentração letal incipiente para ambos os grupos em 0,03 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os copépodos foram mais sensíveis ao TBT que os cladóceros. A molécula cloreto de tributilestanho foi mais tóxica aos crustáceos relativamente ao metacrilato de tributilestanho, não havendo diferenças significativas entre os demais compostos de TBT. O agrupamento das CL_{50} pelos critérios taxonômicos, experimentais e químicos se mostrou útil na revisão da toxicidade do TBT, pois permitiu estimar e comparar as CL_{50} entre os agrupamentos e avaliar a variabilidade dos mesmos.

3.2 INTRODUÇÃO

A revisão da toxicidade de um poluente é a primeira etapa para o estabelecimento de critérios de proteção da vida aquática (EPA, 2003b). Atualmente, revisões periódicas e sistemáticas são facilitadas pela existência de bases de dados disponíveis na internet como a *Pesticide Action Network North America* (PANNA) (KEGLEY *et al.*, 2011), a Ecotoxicology (ECOTOX) (EPA, 2013a) e o sistema ETOX (FEA, 2013). Os critérios para proteção da vida aquática podem ser qualitativos (as concentrações dos poluentes não podem produzir efeitos tóxicos), operacionais (as concentrações não podem exceder 1/10 da CL_{50} -96h do poluente) ou numéricos (estabelecimento de limites para as concentrações do poluente) (EPA, 2003b).

Nos Estados Unidos, os critérios numéricos se baseiam em parâmetros de toxicidade aguda e crônica, bem como nos fatores de bioacumulação dos poluentes. Para proteger a vida aquática dos efeitos agudos são utilizados dois parâmetros de toxicidade: a concentração letal a 50% dos organismos (CL_{50}) e/ou a concentração de efeito a 50% dos

organismos (CE_{50}). A toxicidade aguda do poluente deve ter sido avaliada para ao menos uma espécie animal de oito diferentes famílias: duas famílias de vertebrados, uma família que não seja de artrópodes ou vertebrados, uma espécie da família Penaeidae ou Mysidacea, três famílias de invertebrados e outra família de livre escolha (RUSSO, 2002). Para proteger a vida aquática dos efeitos crônicos, efeitos sub-letais (e.g., redução no crescimento) devem ser quantificados para espécies de três famílias: ao menos uma espécie de peixe, uma de invertebrado e uma espécie agudamente sensível (EPA, 2003b). Deve ser quantificado ainda efeito sobre ao menos uma espécie de alga ou planta vascular, tal como deve ser determinado ao menos um fator de bioconcentração (EPA, 2003b).

A obtenção dos parâmetros acima mencionados permite calcular valores médios para espécies e gêneros (EPA, 2003b; KEGLEY *et al.*, 2011). Este valor médio não considera as diferenças concernentes ao tipo (e.g., testes estáticos e semi-estático) e duração dos bioensaios e quanto aos compostos testados (KEGLEY *et al.*, 2011). Diferenças relativas ao estágio de vida das espécies são consideradas quando há uma variação maior que um fator de 2 entre os parâmetros de toxicidade para cada estágio (RUSSO, 2002). Com os valores médios para cada gênero, torna-se possível construir as curvas de sensibilidade das espécies (em inglês *species sensitivity distribution* - SSD) ao poluente e o estabelecimento do valor agudo final (VAF). Este VAF é a base para o estabelecimento do critério de qualidade para determinado poluente (EPA, 2013b).

A problemática da poluição marinha por TBT surgiu na década de 1970 com registros de desregulação endócrina em moluscos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Atualmente, as concentrações deste poluente são consideradas em diversos critérios de qualidade da água (EPA, 2003a; CEC, 2006) de forma a proteger a vida aquática. O critério estabelecido pela EPA (2003a) para proteção da vida marinha é $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$, equivalendo ao VAF dividido por 2. As concentrações médias de TBT na água do mar, ao longo de três anos, não podem exceder este critério (EPA, 2003a).

Crustáceos são componentes importantes na cadeia trófica marinha e estimativas indicam que neste subfilo existem cerca de 66,000 espécies (LEBLANC, 2007). As espécies de crustáceos possuem complexos mecanismos de detoxificação contra contaminantes, entretanto a sensibilidade destas pode variar drasticamente (JAMES e BOYLE, 1998). O objetivo deste capítulo é revisar a toxicidade aguda do TBT para as espécies pertencentes ao subfilo Crustacea. O efeito de fatores biológicos, químicos e experimentais sobre a variabilidade das CL_{50} foi também avaliado.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 *Revisão da toxicidade aguda para crustáceos*

A revisão da toxicidade aguda dos compostos de tributilestanho para os crustáceos foi feita a partir dos registros disponibilizados na base de dados da *Pesticide Action Network North America* (KEGLEY *et al.*, 2011). Uma pesquisa inicial foi realizada com o termo “*tributyltin*” e todos os compostos de tributilestanho registrados foram analisados quanto à disponibilidade de dados de toxicidade aguda (isto é, CL_{50}). Os valores da CL_{50} foram descritos com informações disponibilizadas na base de dados sobre a espécie biológica utilizada e as condições do bioensaio. As descrições concernentes a espécie foram nome científico e estágio de vida (larval, juvenil e adulto). Em relação às condições experimentais foram registrados o tipo de teste (estático, semi-estático e fluxo contínuo) e o tempo de avaliação (1 a 31 dias). O composto de tributilestanho utilizado nos bioensaios foi registrado como fator químico dos mesmos.

Após esta organização dos dados, as espécies foram primeiramente agrupadas pelo critério taxonômico em Classes do subfilo Crustacea (Copepoda, Malacostraca, Cirripedia e Branchiopoda) e Ordens dentro das respectivas Classes conforme classificação taxonômica proposta por RUPPERT e BARNES (1996). A descrição das espécies foi complementada com informações sobre o ambiente aquático (águas doce, salobra e salgada) e sobre o hábito específico ao estágio de vida da espécie (planctônico, epibentônico e bentônico). O segundo agrupamento dos valores da CL_{50} foi realizado conforme os critérios experimentais, agrupando-se os valores pelo tipo de teste e tempo de avaliação.

Os compostos de tributilestanho foram identificados pelo seu respectivo número CAS (em inglês, *Chemical Abstracts Service*) e caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas a partir dos registros obtidos na base de dados *SciFinder* (ACS, 2012). As propriedades físico-químicas registradas foram peso molecular, solubilidade em água (mg L^{-1}), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}) e fator de bioconcentração (FBC). O terceiro agrupamento dos valores da CL_{50} foi realizado pelo composto de tributilestanho utilizado nos bioensaios.

3.3.2 *Análise estatística da CL_{50} dos compostos de tributilestanho*

A distribuição dos valores da CL_{50} para as espécies de crustáceos foi primeiramente avaliada por meio do gráfico *boxplot*. No primeiro agrupamento foi calculada uma CL_{50} mediana para cada Classe e Ordem dos crustáceos analisada. A variabilidade dos valores foi avaliada calculando-se o 25° e o 75° percentis juntamente com os limites dos valores

outliers para cada distribuição. Para comparar a CL₅₀ mediana entre as Classes e as Ordens foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (KW), aplicando-se o teste de Dunn *a posteriori*. O mesmo procedimento acima descrito foi aplicado para se avaliar o agrupamento das CL₅₀ pelos fatores tipo de teste e composto de tributilestanho. As CL₅₀ agrupadas pelo tempo de avaliação foram descritas pela mediana e pelos 25° e 75° percentis. Posteriormente, a CL₅₀ mediana em função do tempo de avaliação foi modelada pelo ajuste de curvas. Três diferentes modelos foram avaliados: logarítmico ($y = a + b \ln x$), exponencial ($y = a e^{bx}$) e geométrico ($y = ax^b$). O modelo mais adequado foi escolhido pela comparação dos coeficientes de determinação (R^2). Estes modelos também foram utilizados para avaliar a relação entre as CL₅₀ medianas calculadas para os compostos de tributilestanho e as propriedades físico-químicas dos mesmos (peso molecular, solubilidade em água, K_{ow} , K_{oc} e FBC). O nível de significância de 0,05 foi estabelecido para todas as análises.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Propriedades físico-químicas e fatores de bioconcentração do TBT

A base dados da PANNA registra 21 moléculas de TBT (KEGLEY *et al.*, 2011), entretanto apenas para 15 moléculas existem informações quanto às propriedades físico-químicas e fator de bioconcentração (Tabela 3). Estas informações consistem de predições feitas por softwares, sendo considerados os valores de pH 8 e temperatura de 25 °C (ACS, 2012). Para seis moléculas (complexo de cloreto, monopropileno-glicol-maleato, naftenato, neodecanoato, óxido de isotiocianatotrifênilarisina e polimetacrilato de tributilestanho) não existem predições de propriedades físico-químicas e fator de bioconcentração na base *SciFinder* (ACS, 2012).

Os compostos de tributilestanho têm peso molecular variando de 309 a 694 e em geral possuem apenas uma molécula de TBT (massa molecular: 290), com exceção do maleato de tributilestanho, óxido de tributilestanho e sulfeto de tributilestanho, com duas moléculas (Tab. 3). A pressão de vapor destas moléculas varia em onze ordens de magnitude, com a molécula resinato de TBT sendo a menos volátil e a molécula fluoreto de TBT a mais volátil (Tab. 3).

A solubilidade em água das moléculas de TBT varia de 0,000081 a 8,5 mg L⁻¹, correspondendo estes valores às moléculas maleato de TBT e tributilestanho metanosulfonado, respectivamente. O log K_{ow} varia de 2,3 a 10,5 e, relacionado a esta propriedade físico-química, o fator de bioconcentração varia de 36 a 1.000.000. O log K_{oc} varia de 2,66 a 7. Das 21 moléculas de tributilestanho existem estimativas de toxicidade aguda para crustáceos - a partir da CL₅₀ - para apenas 9 moléculas: acetato, acrilato, benzoato, cloreto, fluoreto, metacrilato, naftenato, óxido e sulfeto de TBT.

Tabela 3 - Moléculas de tributilestanho com suas propriedades físico-químicas, fator de bioconcentração (FBC) estimado e fator para conversão das CL₅₀ para base de tributilestanho.

Composto	Número CAS	Peso Molecular	Pressão de Vapor (Pa)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	log K _{ow}	log K _{oc}	FBC	*Fator de Conversão da CL ₅₀
2-piridinacarboxilato de tributilestanho	73149-61-8	412,15	5,6E-05	1,8	3,587	3,33	313	0,7
3-piridinacarboxilato de tributilestanho	27189-59-9	412,15	5,6E-05	3	3,148	3,09	145	0,7
Acetato de tributilestanho	56-36-0	349,1	0,04	6,3	3,208	3,12	162	0,83
Acrilato de tributilestanho	13331-52-7	361,1	0,02	7,2	2,935	2,97	100	0,8
Benzoato de tributilestanho	4342-36-3	411,17	1,36E-04	0,9	4,09	3,6	757	0,71
Cloreto de tributilestanho	1461-22-9	325,5	0,51	0,36	3,855	3,47	501	0,89
Fluoreto de tributilestanho	1983-10-4	309,05	1,8	0,62	3,15	3,09	146	0,94
Isopropilsuccinato de tributilestanho	53404-82-3	449,21	1,95E-05	1,4	3,97	3,54	618	0,65
Linoleato de tributilestanho	24124-25-2	569,49	4,87E-10	0,001	10,547	7	1.00E+06	0,51
Maleato de tributilestanho	14275-57-1	694,16	3,65E-10	0,000081	4,738	3,95	2350	0,84
Metacrilato de tributilestanho	2155-70-6	375,13	0,01	4,1	3,353	3,2	208	0,77
Óxido de tributilestanho	56-35-9	596,1	1,33E-06	0,083	3,84	3,47	488	0,98
Resinato de tributilestanho	13387-91-2	591,5	7,36E-11	0,00095	9,785	6,7	1.00E+06	0,49
Sulfeto de tributilestanho	4808-30-4	612,17	1,65E-07	0,00067	5,87	4,58	17600	0,95
Tributilestanho metanosulfonado	13302-06-2	385,15	4,41E-03	8,5	2,349	2,66	35,9	0,75

*Equivale ao peso atômico do TBT dividido pelo peso molecular do composto.

Fonte: (KEGLEY *et al.*, 2011); *SciFinder* (ACS, 2012).

3.4.2 Agrupamento pela taxonomia do subfilo Crustacea e pelo ambiente

As CL_{50} (N = 136) reportadas para 29 espécies de crustáceos variaram de 0,12 a 7300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (base de TBT) (Fig. 1). As espécies de crustáceos mais resistentes ao TBT apresentaram CL_{50} maiores que 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. As CL_{50} medianas agrupadas por Classes do subfilo Crustacea foram 0,96, 2,75, 4,7 e 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Copepoda, Cirripedia, Branchiopoda e Malacostraca, respectivamente (Fig. 1). Quando os valores foram agrupados por Ordens, as respectivas CL_{50} medianas foram 0,88 e 0,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Harpacticoida e Calanoida (Classe Copepoda); 2, 5,6 e 27,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mysidacea, Amphipoda e Decapoda (Classe Malacostraca); 2,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cirripedia (Classe Cirripedia) e 3,4 e 124 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cladocera e Anostraca (Classe Branchiopoda).

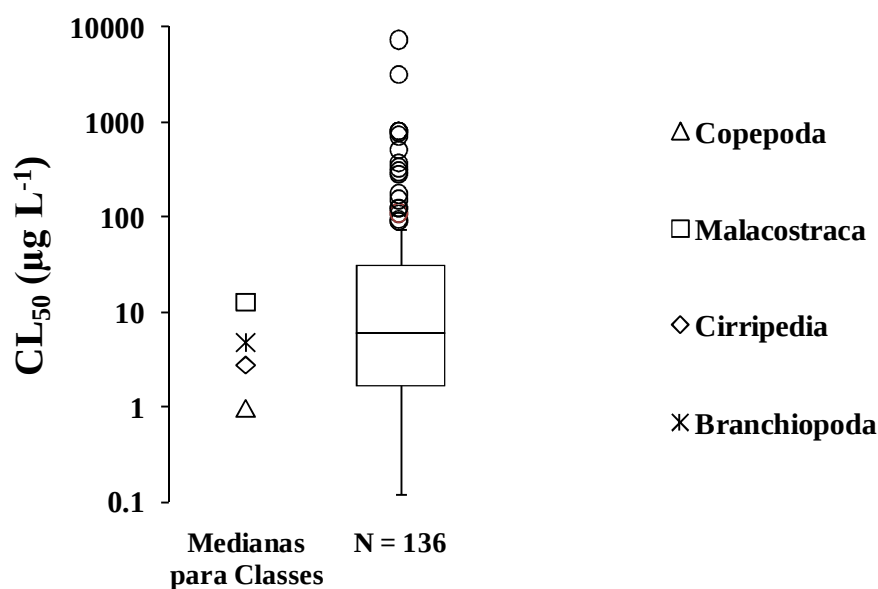


Figura 1 – Boxplot demonstrando a variação das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) registradas para espécies de crustáceos. À esquerda do boxplot estão representadas as CL_{50} medianas calculadas para Classes do subfilo Crustacea.

As distribuições das CL_{50} para as Classes do subfilo Crustacea estão apresentadas na Figura 2. Houve diferenças significativas entre as CL_{50} medianas para as Classes de crustáceos (teste de Kruskal-Wallis, $H = 28,7$, $gl = 3$, $p < 0,0001$). A CL_{50} mediana para a Classe Copepoda foi significativamente menor que as CL_{50} medianas reportadas para as Classes Malacostraca e Branchiopoda (teste de Dunn, $z = 5,3$, $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre as CL_{50} medianas para as Classes Copepoda e Cirripedia (teste de Dunn, $z = 1,35$, $p > 0,05$). A distribuição das CL_{50} para a Classe Copepoda foi menos

variável que as demais distribuições (Fig. 2). A sensibilidade das espécies de crustáceos marinhos e dulcícolas foi comparada através da análise das CL_{50} para a Classe Copepoda (com espécies marinhas e estuarinas) e para a Ordem Cladocera, representada pela espécie de água doce *Daphnia magna* (Fig. 3). A CL_{50} mediana reportada para a Classe Copepoda ($0,96 \mu\text{g L}^{-1}$) foi significativamente menor que a reportada para a Ordem Cladocera ($3,4 \mu\text{g L}^{-1}$) (teste de Kruskal-Wallis, $H = 13,4$, $gl = 1$, $p = 0,0003$).

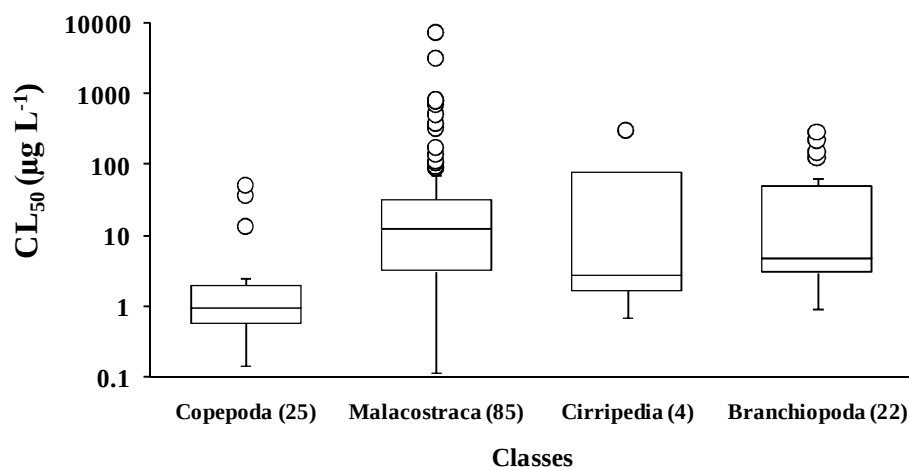


Figura 2 – Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas por Classes do subfiló Crustacea (Copepoda, Malacostraca, Cirripedia e Branchiopoda). Os números entre parênteses equivalem ao N amostral.

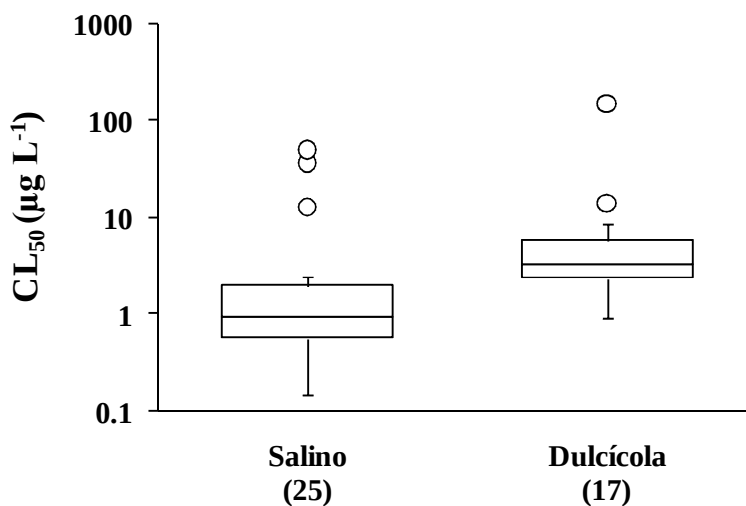


Figura 3 - Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) para crustáceos de água salgada (copépodos) e de água doce (cladóceros). Os números entre parênteses equivalem ao N amostral.

3.4.3 Agrupamento por tipo de teste e tempo de avaliação

As distribuições das CL_{50} para crustáceos, agrupadas pelo tipo de teste, estão apresentadas na Figura 4. As CL_{50} medianas para os testes estático, semi-estático e fluxo contínuo foram, respectivamente, 9,1, 5,9 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, não havendo diferenças significativas entre as mesmas (teste de Kruskal-Wallis, $H = 3,6$, $gl = 2$, $p = 0,16$). Apesar disso, observa-se que a distribuição das CL_{50} para os bioensaios em fluxo contínuo foi menos variável que as demais distribuições (Fig. 4).

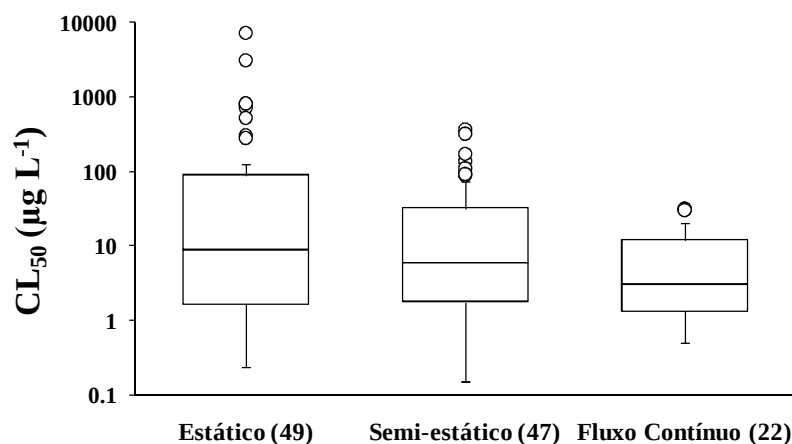


Figura 4 – Boxplots comparando as distribuições das CL₅₀ (µg L⁻¹) agrupadas por tipo de teste (estático, semi-estático e fluxo contínuo). Os números entre parênteses equivalem ao N amostral.

O agrupamento das CL₅₀ pelo tempo de avaliação para todas as espécies de crustáceos está apresentado nas Figuras 5 e 6a, nas quais se observa a redução nas CL₅₀ medianas com o tempo. A redução nas CL₅₀ medianas com o tempo ajustou-se melhor a uma curva geométrica, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,45, 0,74 e 0,74 para os agrupamentos das espécies de crustáceos (Fig. 6a), copépodos (Fig. 6b) e cladóceros (Fig. 6c), respectivamente.

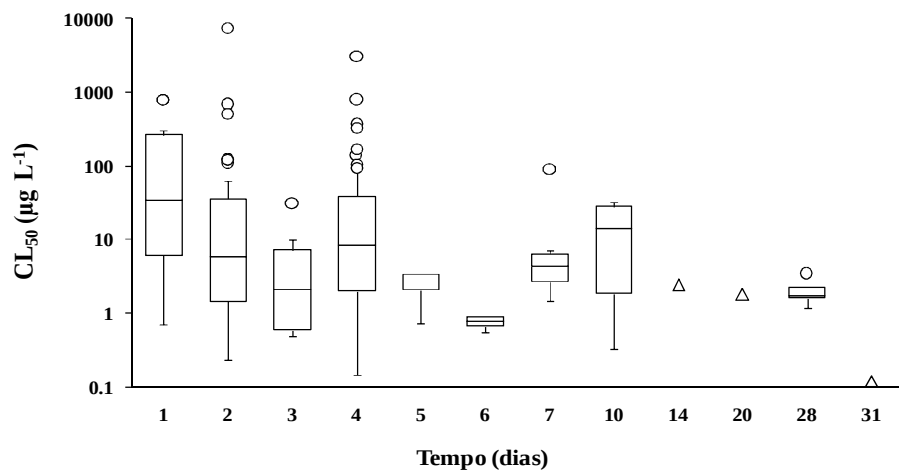


Figura 5 – Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas pelo tempo de avaliação dos bioensaios (1 a 31 dias). Nos bioensaios com 14, 20 e 31 dias estão registrados apenas um valor de CL_{50} , impossibilitando a construção do boxplot.

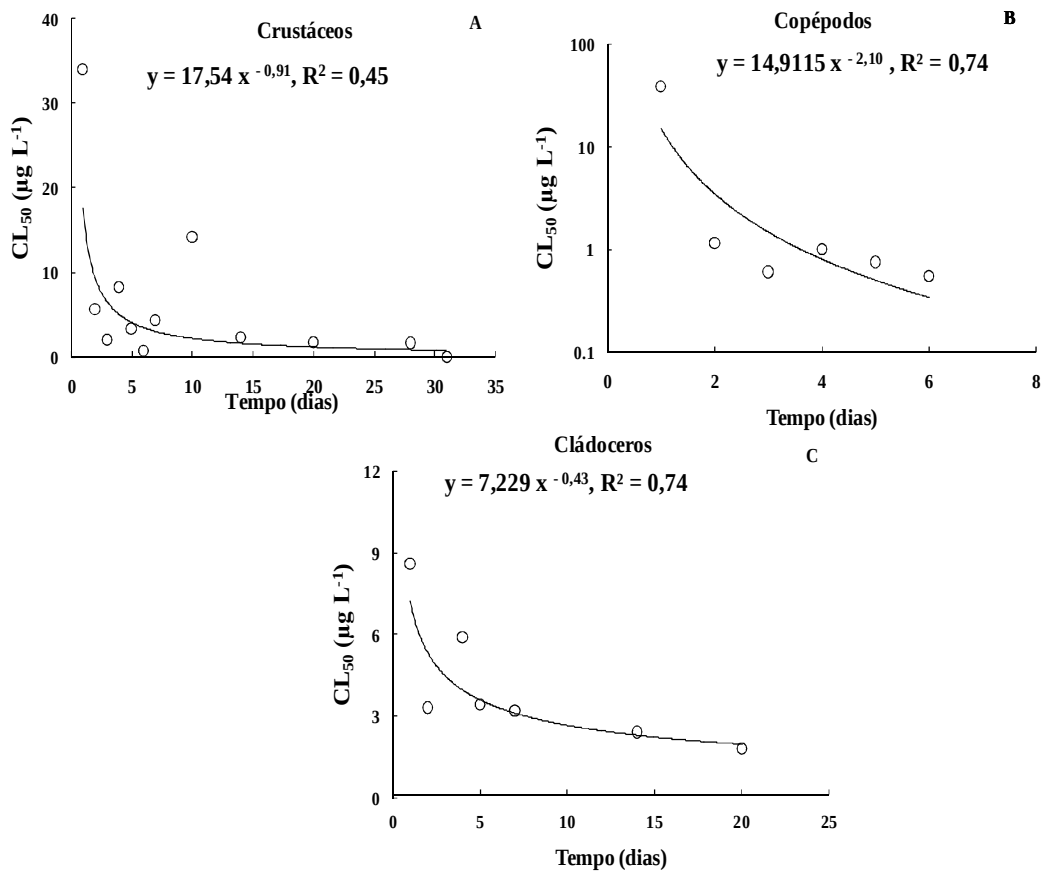


Figura 6 - Gráficos de dispersão apresentando a modelagem da relação CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função do tempo de avaliação (dias) para os crustáceos (A), copépodos (B) e cladóceros (C). Na parte superior do gráfico estão as equações do modelo geométrico ($y = ax^b$) e o coeficiente de determinação (R^2).

3.4.4 Agrupamento por composto de tributilestanho

As distribuições das CL_{50} para cloreto, fluoreto, metacrilato, naftenato e óxido de tributilestanho estão apresentadas na Figura 7, com respectivas CL_{50} medianas de 2,1, 6,7, 89, 82 e $9,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Para as moléculas acetato, acrilato, benzoato e sulfeto de tributilestanho foi reportada apenas uma CL_{50} , equivalendo a 3,3, 123, 4,4 e $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, não sendo possível calcular uma CL_{50} mediana e compará-las pelo teste de Kruskal-Wallis. Visto que a CL_{50} mediana para o naftenato de tributilestanho inclui apenas 2 medidas, esta foi excluída da análise estatística. Houve diferenças significativas entre as CL_{50} medianas reportadas (teste de Kruskal-Wallis, $H = 14$, $gl = 3$, $p = 0,0032$). A CL_{50} mediana para o cloreto foi significativamente menor que a CL_{50} reportada para o metacrilato de tributilestanho (teste de Dunn, $z = 3,37$, $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os demais pares de CL_{50} (teste de Dunn, $z < 2,55$, $p > 0,05$).

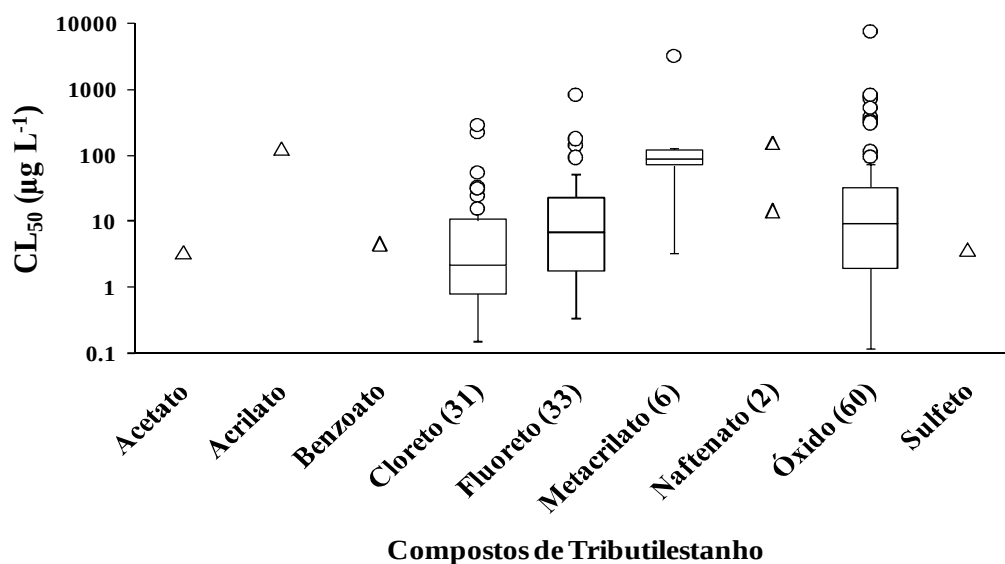


Figura 7 - Boxplots comparando as distribuições das CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) agrupadas de acordo com o grupo aniônico ligado à molécula de TBT. Para as moléculas acetato, acrilato, benzoato e sulfeto só foram registrados um valor de CL_{50} , impossibilitando a construção do boxplot. Para a molécula naftenato de TBT ($N = 2$) também não foi possível construir o boxplot. Os números entre parênteses equivalem ao N amostral.

Quanto às relações entre as CL_{50} medianas para as moléculas de TBT em função das propriedades físico-químicas das mesmas nenhum modelo avaliado ajustou-se significativamente (Fig. 8). A distribuição, entretanto, sugere uma redução na CL_{50} mediana de $123 \mu\text{g L}^{-1}$ para valores $< 19 \mu\text{g L}^{-1}$ com uma diminuição na solubilidade a partir de 7 mg L^{-1} (Fig. 8b). Esta redução se observa com o aumento no $\log K_{ow}$ e o $\log K_{oc}$ a partir do valor 3 (Fig. 8c e d).

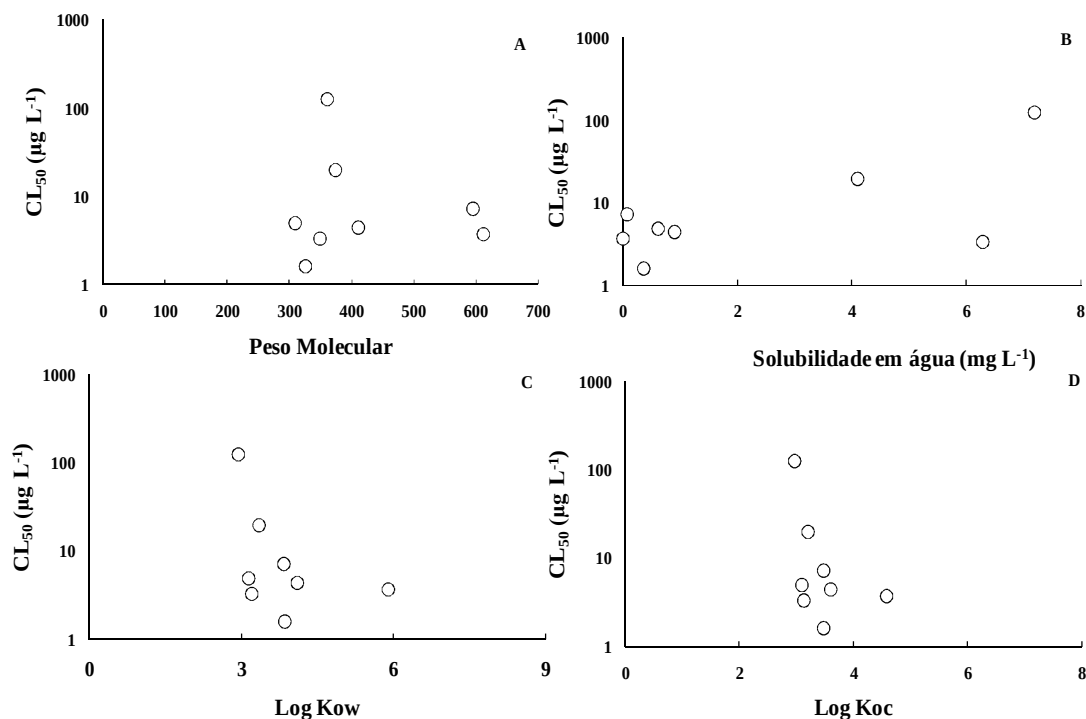


Figura 8 - Gráficos de dispersão apresentando a CL_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função do peso molecular (A), solubilidade em água (mg L^{-1}) (B), $\log K_{ow}$ (C) e $\log K_{oc}$ (D) das moléculas de TBT.

3.5 DISCUSSÃO

As moléculas de TBT são moderadamente solúveis em água, com solubilidade bem abaixo do limite de 100 mg L^{-1} estabelecido pela OECD (2000) para substâncias solúveis. A solubilidade do TBT foi estimada para pH 8 a 25°C , entretanto, na água do mar variações no pH, na salinidade e temperatura alteram a solubilidade deste poluente (INABA *et al.*, 1995). INABA *et al.* (1995) demonstraram que a solubilidade do TBT na água do mar diminui com o aumento da salinidade (de 0 a 32). Em pH 4, INABA *et al.* (1995) estimaram solubilidade de 90 mg Sn L^{-1} , enquanto na faixa de pH entre 6 e 8 a solubilidade foi cerca de 2 mg Sn L^{-1} . A diminuição na temperatura de 25°C para 10°C reduz pela metade a solubilidade do TBT. Nos bioensaios de toxicidade com espécies marinhas estes fatores devem ser considerados, pois podem influenciar nos parâmetros de toxicidade (e.g., CL_{50}).

KWOK e LEUNG (2005) avaliaram o efeito da temperatura e salinidade sobre a CL_{50-96h} do cloreto de tributilestano (TBTCl) para o copépodo *Tigriopus japonicus*. A CL_{50-96h} reduziu com o aumento da temperatura, porém o efeito da salinidade dependeu da temperatura e concentração de TBTCl testadas. KWOK e LEUNG (2005) não explicaram se a variação na CL_{50-96h} esteve relacionada à solubilidade do TBTCl ou à sensibilidade do organismo sob temperatura/salinidade diferente. A temperatura e a salinidade influenciam as

respostas das enzimas acetilcolinesterase e glutathione-S-transferase em *Eurytemora affinis* (CAILLEAUD et al., 2007) e poderiam alterar a sensibilidade dos organismos aos poluentes.

A análise do K_{ow} estimado para as moléculas de tributilestanho indica que tais moléculas são muito lipofílicas. A lipofilicidade das moléculas de tributilestanho está relacionada à natureza da espécie aniônica ligada ao átomo de Sn. Na molécula tributilestanho metanosulfonado, a espécie aniônica é o grupo SO_3-CH_3 , enquanto na molécula linoleato de tributilestanho a espécie aniônica constitui-se no grupo orgânico $C_{17}H_{31}O_2$. A natureza das espécies aniônicas influencia na polaridade da molécula e, conseqüentemente, no grau de lipofilicidade da mesma. Por exemplo, a molécula linoleato de TBT é mais lipofílica ($K_{ow} = 10,5$) do que o tributilestanho metanosulfonado ($K_{ow} = 2,34$).

O log K_{ow} estimado para o TBTCl por BANGKEDPHOL *et al.* (2009) variou de 3,9 a 4,9 em função da salinidade, com maior log K_{ow} reportado para salinidade de 32 a temperatura de 20 °C. BANGKEDPHOL *et al.* (2009) reportaram que o aumento no K_{ow} com aumento na salinidade está relacionado ao efeito “salting out” e, dessa forma, aumentaria o acúmulo de TBT nos organismos. A relação entre K_{ow} e salinidade deve ser considerada nos bioensaios de toxicidade, pois pode aumentar a variabilidade destes resultados. Para bioensaios com espécies marinhas ou estuarinas, a solução seria a padronização da salinidade nos mesmos. A salinidade também influencia a partição do TBT para o sedimento (HOCH *et al.*, 2002; BANGKEDPHOL *et al.*, 2009).

O fator de bioconcentração expressa a razão entre a concentração do poluente nos organismos e na água. Na água do mar, fatores como pH, ácidos húmicos e concentração da matéria orgânica dissolvida alteram as estimativas dos fatores de bioconcentração (FENT e LOOSER, 1995; HAITZER *et al.*, 1998). Nos organismos, a estimativa do fator de bioconcentração leva em consideração o balanço entre a taxa de absorção e de eliminação do poluente (MEADOR, 1997).

O agrupamento das CL_{50} pelo critério taxonômico se mostrou útil para avaliar a sensibilidade das espécies de crustáceos ao TBT. O agrupamento pelas Classes do subfilo Crustacea mostrou que as espécies de copépodos foram as mais sensíveis à toxicidade aguda do tributilestanho. As CL_{50} reportadas para a Classe Copepoda foram menos variáveis relativamente às demais Classes, contudo isto pode estar relacionado aos estágios de vida dos organismos. Na Classe Copepoda, só foram reportadas CL_{50} para indivíduos adultos, enquanto nas demais Classes incluíram-se CL_{50} para larvas, jovens e adultos.

A diferença na sensibilidade das espécies de crustáceos ao TBT está relacionada a dois fatores: 1) diferenças nas taxas de absorção deste poluente pelas espécies e 2) diferenças nos sistemas de detoxificação das mesmas. A absorção do TBT pelos crustáceos pode variar em função do estágio de vida, tamanho, sexo, estágio reprodutivo, estado nutricional, atividade metabólica e da via de exposição (e.g., água e alimentação) (MCGEE *et al.*, 1998). A maior absorção de TBT a partir da água ocorre no estágio de vida larval, pois este apresenta maior proporção área/volume e exoesqueleto mais fino (VERRIOPOULOS e MORAITOU-

APOSTOLOPOULOU, 1982). As fêmeas tendem a ser mais resistentes que os machos, pois transferem o TBT para os ovos (SHIMASAKI *et al.*, 2008; ARA *et al.*, 2010), porém podem ser mais sensíveis após desova (PEREZ-LANDA *et al.*, 2008). Crustáceos com maior atividade metabólica podem absorver mais TBT a partir de exposições aquosas (MOORE *et al.*, 1997).

Entre os crustáceos existem diferenças interespecíficas na detoxificação do TBT (RICE *et al.*, 1989; JAMES e BOYLE, 1998; OHJI *et al.*, 2002). A detoxificação em crustáceos envolve a debutilação da molécula através do sistema enzimático P450 (JAMES e BOYLE, 1998). Através da debutilação, por exemplo, o percentual de butilestanhos (somatório de TBT, DBT e MBT) nos tecidos da espécie de caranguejo *Callinectes sapidus* reduziu de 93% para 3,2% ao longo de 12 dias (RICE *et al.*, 1989). Anfípodos gamarídeos metabolizaram o TBT mais eficientemente que anfípodos caprelídeos. Esta diferença se refletiu na CL₅₀-48h estimada para ambos os grupos: para caprelídeos variou de 1,2 a 6,6 µg L⁻¹, enquanto para gamarídeos variou de 17,8 a 23,1 µg L⁻¹ (OHJI *et al.*, 2002). Diferenças nas enzimas do sistema P450 podem influenciar a eficiência da detoxificação e, conseqüentemente, os parâmetros de toxicidade (KIM *et al.*, 2011). Além disso, diferenças na sensibilidade das espécies podem decorrer da capacidade do sistema biológico para manter seu equilíbrio interno após exposição a poluentes (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Poluentes como o TBT induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem danificar macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos e comprometer o a síntese de ATP na mitocôndria (HOLLINGWORTH *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2011).

Os modelos de água salgada (copépodos) foram mais sensíveis ao TBT relativamente ao modelo de água doce (*D. magna*). A variação na sensibilidade destes microcrustáceos pode estar relacionada a diferenças no balanço absorção/eliminação do TBT pelos organismos e a diferenças na especiação do TBT no ambiente marinho e dulcícola devido a variações no pH. A taxa de absorção (k_u) do TBT foi quantificada para poucos crustáceos marinhos (e.g., anfípodos *Rhepoxynius abronius*, com k_u de 15 mL g⁻¹ h⁻¹, e *Eohaustorius washingtonianus*, com k_u de 305 mL g⁻¹ h⁻¹) e dulcícolas (e.g., *D. magna*, com k_u de 4,85 mL g⁻¹ h⁻¹) (FENT e LOOSER, 1995; MEADOR, 1997). As taxas de eliminação (k_e) do TBT indicam que a eliminação se processa lentamente, com taxas de 0,0075, 0,002 e 0,025 h⁻¹ para as espécies *R. abronius*, *E. washingtonianus* e *D. magna*, respectivamente (FENT e LOOSER, 1995; MEADOR, 1997).

A absorção do TBT pelos organismos está relacionada à fração biodisponível na água, que depende da concentração da matéria orgânica dissolvida (MOD) (FENT e LOOSER, 1995; ARNOLD *et al.*, 1998; LOOSER, 2000). FENT e LOOSER (1995) reportaram que houve uma redução de 55% na bioconcentração de TBT por *D. magna* em concentrações da MOD variando de 0 a 10 mg L⁻¹. Esta redução pode ser maior à medida que se aumenta o tempo de exposição de *D. magna* ao TBT (FENT e LOOSER, 1995). Para contaminantes orgânicos, em geral, há uma redução no fator de bioconcentração em altas concentrações da MOD (HAITZER *et al.*, 1998). Apesar dos resultados acima reportados, é possível que o efeito da MOD sobre a bioconcentração de TBT seja menos pronunciado em copépodos,

visto que estágios larvais podem se alimentar da MOD (e.g., exudatos orgânicos de microalgas) (DECHO e FLEEGER, 1988). Na presente revisão não foi possível avaliar o efeito da MOD sobre a CL_{50} dos modelos de água doce e salgada, pois este fator não foi reportado para o conjunto de bioensaios revisado.

O efeito do pH na especiação do TBT na água foi analisado por RADKE *et al.* (2008). Em pH 8, predomina a espécie neutra de TBT (TBTOH), enquanto, em $pH < 6$, predomina o cátion TBT^+ . A espécie TBTOH é absorvida pelas células mais facilmente do que o TBT^+ (FENT e LOOSER, 1995) e isto poderia explicar a diferença na sensibilidade entre os modelos de água doce e salgada. Segundo BANGKEDPHOL *et al.* (2009), o efeito *salting out* relacionado aos sais dissolvidos na água do mar poderia aumentar o fator de bioconcentração do TBT pelas espécies marinhas. Este segundo fator também explicaria a maior sensibilidade dos modelos marinhos.

A redução da CL_{50} com o tempo melhor se ajustou para as Classes Copepoda e Cladocera, ambas com R^2 de 0,74. Estes ajustes permitiram estimar a concentração letal incipiente, abaixo da qual a mortalidade numa população não atinge 50%. Dessa forma, mais que 50% dos organismos conseguem completar seu ciclo de vida, garantindo a manutenção da população. A concentração incipiente foi calculada a partir das equações fornecidas para os copépodos e cladóceros (Fig. 5b, c). Foi considerado o tempo de 20 dias, visto que este é o tempo estimado para que os copépodos e *D. magna* se tornem adultos e produzam várias ninhadas, garantindo a manutenção da população em níveis ecologicamente aceitáveis para a perpetuação das espécies. Para os copépodos adultos esta concentração foi estimada em $0,03 \mu g L^{-1}$, enquanto para *D. magna* foi $2 \mu g L^{-1}$. Estas concentrações encontram-se acima dos critérios de qualidade da água estabelecidos no Canadá, na Austrália e na União Européia (Tab. 4), sugerindo que estes critérios podem ser considerados seguros para espécies de microcrustáceos. Entretanto, as concentrações de $0,37 \mu g L^{-1}$ definida pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, 2005) para água salobra e de $0,42 \mu g L^{-1}$ pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA, 2003a) foram maiores que a concentração incipiente para copépodos. Dessa forma, estes limites possivelmente não estejam adequados para proteção de populações de copépodos. Nenhum dos limites estabelecidos pelos critérios de qualidade de água doce excederam a concentração incipiente para *D. magna*.

Tabela 4 – Limites regulatórios do tributilestano (TBT) estabelecidos em critérios de qualidade da água no Brasil, EUA, Canadá, Austrália e Comunidade Européia.

Limites estabelecidos em legislação ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Água Salgada/Salobra	Água doce	Órgão (País)
0,01/0,37	0,063	CONAMA 357 (Brasil)
0,42	0,46	USEPA (EUA)
0,001	0,008	CCME (Canadá)
0,002	0,008	EPA (Austrália)
0,0002	0,0002	CEC (União Européia)

Nota: **CONAMA:** Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, 2005), **USEPA:** United States Environmental Protection Agency (EPA, 2003a); **CCME:** Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME, 2012); **EPA:** Environmental Protection Authority (EPA, 1993); **CEC:** Commission of the European Communities (CEC, 2006).

A ausência de diferenças significativas entre as CL_{50} obtidas nos testes estáticos, semi-estáticos e de fluxo contínuo deve ser interpretada com cautela. A escolha do tipo de teste deve considerar fatores biológicos, químicos e experimentais. O principal fator biológico a ser considerado na escolha do teste é a concentração dos produtos de excreção nos sistemas dos bioensaios. Elevadas concentrações de amônia podem alterar a sensibilidade dos organismos e ter um efeito sinérgico com o contaminante em consideração (MOORE *et al.*, 1997). O fator químico consiste na manutenção da concentração de exposição nos sistemas de bioensaio. A GESAMP (2002) classifica os compostos orgânicos como prontamente biodegradáveis (com baixa persistência no ambiente) e não prontamente biodegradáveis (com elevada persistência). Dessa forma, quando os bioensaios com determinado composto forem realizados em condições (e.g., alimentação e exposição à luz) e períodos maiores que a meia-vida estimada, deve ser conduzido um teste em fluxo contínuo. O TBT é caracterizado como uma molécula estável, com persistência na água de baixa a moderada e meia-vida variando de dias a semanas (BENSON, 1999). Pelo critério químico, bioensaios com o TBT em períodos menores que uma semana, sem alimentação e exposição à luz, podem ser conduzidos em condições estáticas. O fator experimental consiste na manipulação dos organismos durante bioensaios semi-estáticos. Copépodos bentônicos são geralmente resistentes à manipulação em laboratório, entretanto espécies mais sensíveis podem morrer devido ao excesso de manipulação (DIZ *et al.*, 2009). A desconsideração destes fatores pode aumentar a variabilidade dos resultados dos bioensaios.

A espécie aniônica ligada ao átomo de Sn parece influenciar as propriedades físico-químicas das moléculas de TBT, entretanto não tem um efeito significativo sobre a toxicidade destas. As exceções são cloreto e metacrilato de TBT, sendo o TBTCl 42 mais tóxico para os crustáceos que o metacrilato. Para a espécie marinha *Penaeus duorarum*, a CL_{50} -96 h média para o TBTO foi $9 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto para o metacrilato de TBT a CL_{50} -96 h foi $106 \mu\text{g L}^{-1}$ (KEGLEY *et al.*, 2011). A diferença na toxicidade dos compostos de TBT pode ser menos perceptível para espécies resistentes, tal como *Artemia salina*. Para o estágio larval de *A. salina*, a CL_{50} -24 h média do TBTCl foi $250 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto para o metacrilato

de TBT a CL_{50} -48 h média foi $93 \mu\text{g L}^{-1}$ (KEGLEY *et al.*, 2011). O naftenato de TBT não foi comparado aos demais compostos pela escassez de CL_{50} reportadas (apenas 2 para a espécie de água doce *D. magna*). Para esta espécie, o naftenato foi 158 vezes menos tóxico que o TBTCl (KEGLEY *et al.*, 2011). No composto metacrilato de TBT, o estanho liga-se ao grupo orgânico carboxílico ($-\text{COO}^-$) por meio de ligação covalente. Esta ligação faz com que a liberação do tributilestanho seja mais controlada, enquanto que no TBTCl a rápida dissociação da ligação Cl-Sn facilitaria a absorção do TBT pelos organismos (SUBRAMANIAN, 1985).

As relações entre as CL_{50} medianas e as propriedades físico-químicas das moléculas de TBT não se ajustaram significativamente a nenhum modelo. A ausência de ajustes significativos pode ser decorrente da grande variabilidade associada a fatores biológicos, mascarando o efeito dessas propriedades. A redução de 84% na CL_{50} com a diminuição na solubilidade e aumento nos coeficientes de partição sugere, entretanto, que estas propriedades têm um efeito importante sobre a toxicidade do TBT para crustáceos.

A revisão da toxicidade aguda do TBT foi útil para avaliar a variabilidade das CL_{50} entre as espécies de crustáceos. Os agrupamentos foram válidos para permitir comparações em elevados níveis taxonômicos (Classes e Ordens) e segundo critérios experimentais. A elevada variabilidade biológica pode mascarar o efeito de outras variáveis importantes (e.g., propriedades físico-químicas dos contaminantes) nos bioensaios. Apesar disso, fatores experimentais e químicos devem ser considerados nas comparações das CL_{50} entre as espécies.

4. CAPÍTULO 2

TOXICIDADE AGUDA DO TRIBUTILESTANHO (TBT) DISSOLVIDO NA ÁGUA PARA O COPÉPODO MARINHO *TISBE BIMINIENSIS*

4.1 RESUMO

Copépodos são importantes na cadeia trófica marinha e são sensíveis a contaminantes orgânicos liberados no ambiente. O objetivo deste capítulo foi avaliar a toxicidade aguda do TBT dissolvido na água para o copépodo marinho *T. biminiensis*. Para avaliar a toxicidade do TBT, foram escolhidas seis concentrações entre 9,8 e 68,6 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. Acetona foi utilizada como solvente orgânico, não excedendo a concentração de 24 $\mu\text{L L}^{-1}$. Cinco bioensaios foram feitos em recipientes de vidro, sem alimentação e sem exposição à luz. Os bioensaios duraram 48 h, quantificando-se o número de mortos a cada 24 h. As $\text{CL}_{50-24\text{h}}$ e $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ médias para o TBT foram 37 e 36 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectivamente, com razão média entre ambas em torno de 1. *T. biminiensis* foi menos sensível ao TBT relativamente a outras espécies de copépodos bentônicos. Em geral, copépodos bentônicos são menos sensíveis ao TBT do que copépodos planctônicos. A concentração de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ deve proteger populações de copépodos de efeitos agudos associados ao TBT. A razão $\text{CL}_{50-24\text{h}}/\text{CL}_{50-48\text{h}}$ para o TBT foi menor que a obtida para o cromo e para a amônia, sugerindo que o TBT é absorvido por *T. biminiensis* mais rapidamente do que o cromo e amônia.

4.2 INTRODUÇÃO

Os compostos de tributilestanho (TBT) foram aplicados como biocidas anti-incrustantes a partir da década de 1960 (WHO, 1990). Estes compostos foram reconhecidos como biocidas perfeitos e tornaram-se os principais sistemas anti-incrustantes (SAI) aplicados em navios. CHAMP (2001) estimou que o TBT foi aplicado entre 70-80% dos 80.000 navios da frota mercante global.

O uso difuso do TBT rapidamente se constituiu num problema de poluição marinha. Na década de 1970, declínios em populações de ostras e anomalias na calcificação das carapaças destas foram observados na baía de Arcachon (França) (ALZIEU *et al.*, 1986). As anomalias na calcificação foram correlacionadas às concentrações de TBT na água da baía (ALZIEU *et al.*, 1982). Bioensaios em laboratório com a ostra *C. gigas* estabeleceram a relação dose-resposta entre o TBT e as anomalias (HIS e ROBERT, 1985). Posteriormente foram reconhecidos outros efeitos tóxicos associados ao TBT como indução do imposex em moluscos (BIGATTI *et al.*, 2009), redução no sucesso reprodutivo em anfípodos (AONO e TAKEUCHI, 2008) e alteração na proporção macho-fêmea em copépodos (HUANG *et al.*, 2006).

Os efeitos associados ao TBT mobilizaram a IMO para proibir o uso destes como SAI (CHAMP, 2003). Em 2001, a IMO propôs uma convenção para o controle do uso de sistemas anti-incrustantes danosos em embarcações (em inglês, *Control of Use of Harmful Anti-fouling Systems on Ships* (IMO, 2001). As metas desta convenção (banimento total do

uso de TBT em sistemas anti-incrustantes) foram ousadas, porém a adesão das partes foi tímida. Oficialmente esta convenção entrou em vigor apenas em 17/09/2008 e atualmente tem 63 países parte, cuja frota equivale a 81% da frota global (IMO, 2012).

Após a convenção da IMO, as concentrações de TBT na água do mar começaram a declinar (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Contudo, atualmente estas concentrações ainda são consideradas elevadas. LIU *et al.* (2011) reportaram concentrações de TBT variando de 17 a 274 ng L⁻¹ em área de maricultura em Taiwan. Amostras de água do Porto de Gdynia (Polônia) apresentaram concentrações de TBT variando 12,6 a 191 ng L⁻¹ (RADKE *et al.*, 2012). Na costa mediterrânea da Espanha, MARTÍ *et al.* (2011) reportaram concentrações de TBT de 26 ng L⁻¹. Todas essas concentrações excedem os limites estabelecidos por várias agências de proteção ambiental (EPA, 2003a; CEC, 2006; CCME, 2012).

A toxicidade do TBT na água tem sido avaliada para espécies de microalgas (SIDHARTHAN *et al.*, 2002), moluscos (HAGGER *et al.*, 2005), ouriços-do-mar (PERINA *et al.*, 2011), anfípodos (OHJI *et al.*, 2002) e copépodos (KWOK e LEUNG, 2005; KARLSSON *et al.*, 2006; BAO *et al.*, 2011). Estes últimos são adequados como modelos para bioensaios, pois são cosmopolitas, têm ciclo de vida curto e são fáceis de manipular e manter em laboratório (DIZ *et al.*, 2009). Os cultivos de copépodos em laboratório têm sido padronizados e fornecem organismos saudáveis para os bioensaios (RIBEIRO e SOUZA-SANTOS, 2011).

A toxicidade do TBT para copépodos foi estimada para poucas espécies (e.g., *Nitocra spinipes*, *Tigriopus japonicus*, *Eurytemora affinis*, *Acartia tonsa*, *Pseudodiaptomus marinus*) (KEGLEY *et al.*, 2011). Como nova opção para os bioensaios, *Tisbe biminiensis* tem sido proposto como modelo para espécies de copépodos bentônicos tropicais (ARAUJO-CASTRO *et al.*, 2009). Esta espécie se distribui ao longo da zona costeira do Atlântico e vive associada a macroalgas bentônicas (VOLKMANN-ROCCO, 1973). Nos cultivos em laboratório, *T. biminiensis* apresenta elevadas taxas de crescimento populacional (PINTO *et al.*, 2001). O objetivo deste capítulo é avaliar a toxicidade aguda do tributestanho dissolvido em água para fêmeas ovígeras de *T. biminiensis*.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 *Cultivo do organismo modelo*

O copépodo marinho *T. biminiensis* se distribui ao longo da zona costeira do Atlântico tropical e pode ser encontrado associado às macroalgas bentônicas (VOLKMANN-ROCCO, 1973). Para obtenção de espécimes de *T. biminiensis*, areia e macroalgas foram coletadas na Praia do Farol, em Olinda (PE), e, em laboratório, as amostras foram lavadas em água do mar para remoção dos organismos. Fêmeas ovígeras foram isoladas com auxílio de microscópio estereoscópico e identificadas conforme descrição feita por Volkmann-Rocco (1973). O cultivo em laboratório desta espécie foi realizado segundo as condições ótimas estabelecidas por Pinto *et al.* (2001), Araújo-Castro e Souza-Santos (2005), Souza-Santos *et al.* (2006) e Ribeiro e Souza-Santos (2011). As condições de cultivo são ausência de substrato, salinidade de 30-38, temperatura de 28-30 °C e alimentação à base de ração para peixe e diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* ou *Chaetoceros calcitrans*. A água do mar utilizada para manutenção dos cultivos foi coletada na praia de Barra de Sirinhaém, nas dependências da empresa de maricultura Potiporã, e filtrada sequencialmente por filtros CUNO® de 25 e 3 µm, após o que foi esterilizada pela exposição à radiação ultravioleta.

4.3.2 *Preparo das soluções*

O óxido de tributilestanho (TBT) foi adquirido da companhia Sigma-Aldrich e possui as seguintes especificações: grau de pureza 96%, peso molecular de 596,10 g mol⁻¹, densidade relativa de 1,17 g mL⁻¹ a 25 °C e pressão de vapor menor que 0,01 Pa a 25 °C. Uma solução estoque de TBT foi preparada em acetona a uma concentração de 5,7 g TBT L⁻¹ (Fig. 9) e armazenada em freezer a -20 °C. A partir dessa solução estoque foram preparadas soluções intermediárias em água do mar com concentração de 2866 µg TBT L⁻¹ e 0,5 mL L⁻¹ de acetona. Foram realizados cinco bioensaios de toxicidade e a faixa das concentrações-teste foi definida entre 9,8 e 68,6 µg TBT L⁻¹, inserindo-se sempre um mínimo de seis concentrações nesta faixa. Para cada bioensaio foi feita uma solução de trabalho em água do mar a partir da solução intermediária. As soluções de trabalho foram usadas para preparar as diluições nos recipientes-teste.

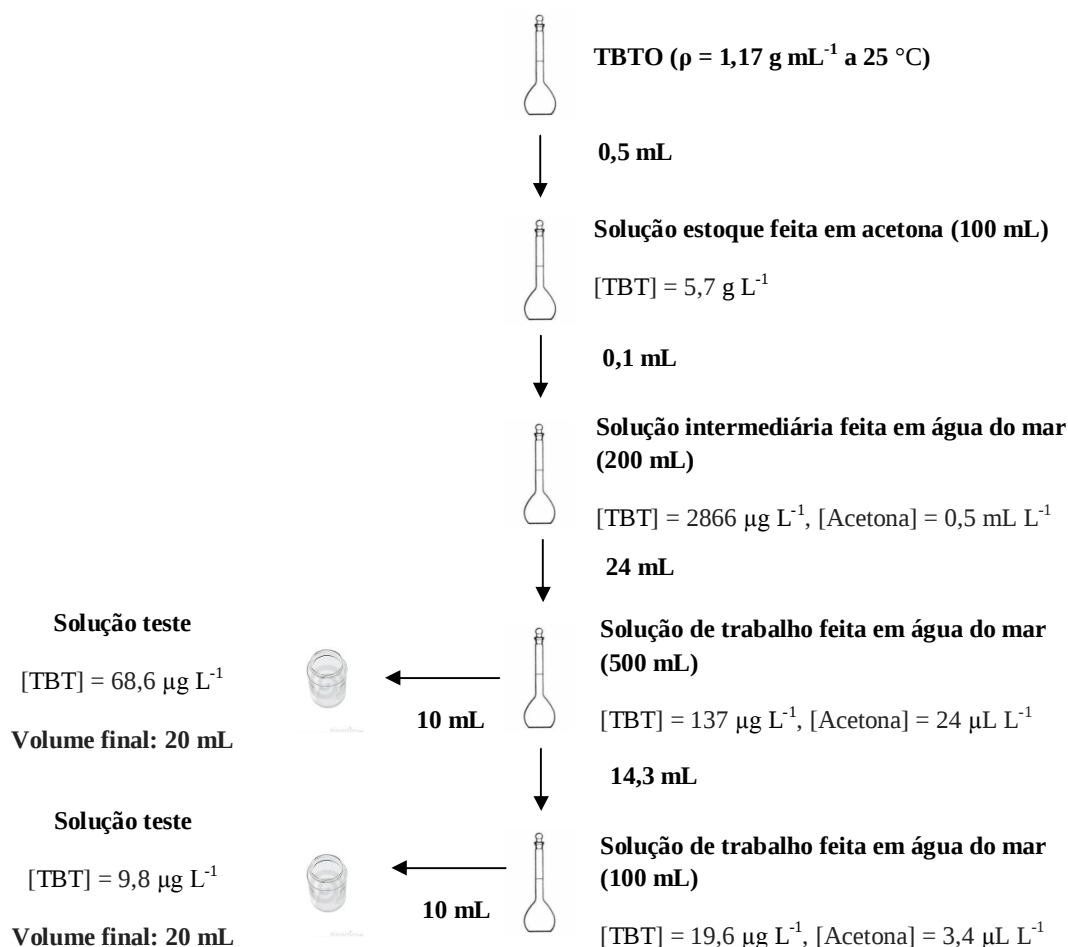


Figura 9 – Esquema de preparo das soluções estoque, intermediária e trabalho para os bioensaios com *T. biminensis*. As soluções-teste equivalem às concentrações de tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$) dissolvido na água dos recipientes dos bioensaios.

4.3.3 Bioensaios com *T. biminensis*

Os bioensaios com *T. biminensis* foram realizados segundo padronização estabelecida por Araújo-Castro *et al.* (2009), com adaptações para avaliar a toxicidade do TBT. Conforme esta padronização, nos bioensaios foram utilizadas fêmeas com idade estimada entre 7 e 10 dias de vida portando seu primeiro saco ovífero. Para obtenção destas fêmeas com idade controlada, indivíduos adultos ($> 250 \text{ } \mu\text{m}$), entre os quais fêmeas ovíferas, foram separados dos cultivos de manutenção e colocados no sistema de desova descrito por Oliveira (2011). Este sistema foi dividido em dois compartimentos por meio de uma peneira de $120 \text{ } \mu\text{m}$ e permitiu que as fêmeas ovíferas colocadas no compartimento superior desovassem por um período de 24 h. Apenas os náuplios recém-eclodidos passaram pela

peneira, permanecendo no fundo do compartimento inferior. Esses náuplios foram retirados do sistema e cultivados até que atingissem a maturidade, com a visualização de fêmeas portando sacos ovígeros. O sistema permitiu a obtenção de lotes de organismos com idade homogênea para utilização nos bioensaios.

Os bioensaios foram realizados em recipientes de vidro transparentes e em cada recipiente foram primeiramente adicionados 10 mL de água do mar. Em cada recipiente foram colocadas 10 fêmeas ovígeras separadas dos cultivos com auxílio de pipeta Pasteur e visualizadas pela exposição à luz. Após adição das fêmeas ovígeras, 10 mL da solução trabalho foi adicionada a cada recipiente e após esta adição iniciou-se o bioensaio. Os bioensaios duraram 48 h e foram conduzidos sem adição de ração ou microalgas como alimento. Devido à ausência de alimentação, os recipientes não ficaram expostos à luz no decorrer dos bioensaios e estiveram fechados com tampa plástica para evitar evaporação excessiva. O número de mortos em cada recipiente foi registrado a partir da observação, em microscópio estereoscópico, dos indivíduos imóveis no fundo ou com a região do urossomo perpendicular ao prossomo, posição característica de indivíduos mortos. Os animais imóveis que não encontravam-se em posição característica foram classificados como mortos quando não foram observados movimentos dos apêndices externos e/ou movimentos do sistema digestivo interno. A contabilização dos indivíduos mortos foi realizada a cada 24 h, sendo estes retirados dos recipientes. Em cada bioensaio foram feitos os tratamentos controle (água do mar) e controle do solvente (água do mar + acetona). Na maior concentração de TBT testada, a concentração da acetona não excedeu $24 \mu\text{L L}^{-1}$, abaixo da concentração de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ estabelecida pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) para ensaios ecotoxicológicos (OECD, 2000). Para cada tratamento foram feitas 4 réplicas.

Nos bioensaios foram utilizadas as concentrações nominais baseando-se nos resultados reportados por OHJI *et al.* (2002) para testes com o TBTCl. A confiabilidade de que as concentrações nominais de tributilestanho são representativas das concentrações reais no bioensaio tem sido reportada em diversas publicações (ARA *et al.*, 2010; REVATHI e MUNUSWAMY, 2010). A ausência de alimentação com microalgas, sem necessidade de exposição dos recipientes-teste à luz, também favoreceu a manutenção das concentrações nominais de TBT no decorrer dos bioensaios. A água utilizada nos bioensaios foi filtrada ($0,45 \mu\text{m}$) e teve as seguintes características: salinidade de 34, oxigênio dissolvido médio de $6 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ com percentual de saturação acima de 70% e pH médio de $8,1 \pm 0,1$. Os bioensaios foram conduzidos à temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3.4 Análise dos dados

4.3.4.1 Cálculo e comparação das CL_{50}

As CL_{50} -24h e CL_{50} -48h foram estimadas pelo método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON *et al.*, 1977) a partir da versão 1.5 disponibilizada pela *United States Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) (EPA, 1990). Para avaliar diferenças entre pares de CL_{50} -48h foi utilizada a fórmula proposta por Sprague e Fogels (1976) e endossada pela U.S. EPA (USEPA, 1985):

$$G = \sqrt{\left[\log\left(\frac{LS(1)}{CL(1)}\right)\right]^2 + \left[\log\left(\frac{LS(2)}{CL(2)}\right)\right]^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

G: parâmetro de magnitude

LS(1): limite superior do intervalo de confiança obtido para a CL_{50} -48h do bioensaio 1

CL(1): CL_{50} -48h do bioensaio 1

LS(2): limite superior do intervalo de confiança obtido para a CL_{50} -48h do bioensaio 2

CL(2): CL_{50} -48h do bioensaio 2

Obtido o valor de G, foram então calculados os valores H e Z pelas seguintes equações:

$$H = 10^G \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Z = \frac{\text{Maior } CL_{50}}{\text{Menor } CL_{50}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:

H e Z: parâmetros de comparação

Maior CL_{50} : maior valor da CL_{50} -48h entre o par das CL_{50} comparadas.

Menor CL_{50} : menor valor da CL_{50} -48h entre o par das CL_{50} comparadas.

Os valores H e Z foram comparados. De acordo com Sprague e Fogels (1976), se $Z > H$ existe diferença significativa entre o par das CL_{50} -48 h comparadas.

A razão entre a CL_{50} -24h e a CL_{50} -48h foi calculada para avaliar a redução deste parâmetro com o tempo e comparada com razões análogas obtidas a partir dos resultados publicados por Araújo-Castro *et al.* (2009) e Araújo (2005) para o cromo e a amônia, respectivamente, em experimentos com *T. biminiensis*.

4.3.4.2 Cálculo da CENO e CEO

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar diferenças significativas entre a mortalidade média nas concentrações testadas. O teste de Dunnet foi utilizado *a posteriori* para comparar o controle e os tratamentos a fim de estabelecer a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). Na comparação da mortalidade média feita pelo teste de Dunnet, a CENO é a maior concentração na qual a mortalidade média não foi significativamente diferente do controle. A CEO, por outro lado, é a menor concentração na qual a mortalidade média foi significativamente diferente do controle. A ANOVA foi aplicada após transformação dos dados pela função arco-seno a fim de normalizar os mesmos (ZAR, 1999). O nível de significância em todas as análises foi 0,05. Os pressupostos da normalidade e da homogeneidade de variâncias foram avaliados pelos testes de Lilliefors e de Bartlett, respectivamente.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Registro da CL_{50} para *Tisbe biminiensis*

As curvas de mortalidade das fêmeas de *T. biminiensis* em função da concentração de TBT dissolvido na água do mar são apresentadas na Fig. 10. Com 48 h de observação, as mortalidades percentuais médias no controle e no controle do solvente foram 0,12% e 0,25%, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre estes tratamentos (teste t pareado, $t = -0,53$, $gl = 4$, $p = 0,62$). As CL_{50} -24h e CL_{50} -48h médias foram $37 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ e $36 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Fig. 11), respectivamente, com uma razão CL_{50} -24h/ CL_{50} -48h média igual a 1 (coeficiente de variação de 1%). Os coeficientes de variação (CV) para as CL_{50} -24h e CL_{50} -48h foram 24% e 25%, respectivamente. A comparação pareada das CL_{50} -48h pela fórmula proposta por Sprague e Fogels (1976) indicou que os pares das CL_{50} foram diferentes, com exceção do par formado pelos resultados dos bioensaios 2 e 4 (Tab. 5). As CENO foram 39, < 24, 29, 24 e $34 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ nos bioensaios 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, com valor mediano de $29 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (teste de Dunnett, $Q < 1,26$, $p >$

0,05). As CEO foram 49, 24, 34, 29 e 39 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ nos bioensaios de 1 a 5, respectivamente, com valor mediano de 34 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (teste de Dunnett, $Q > 1,26$, $p < 0,05$).

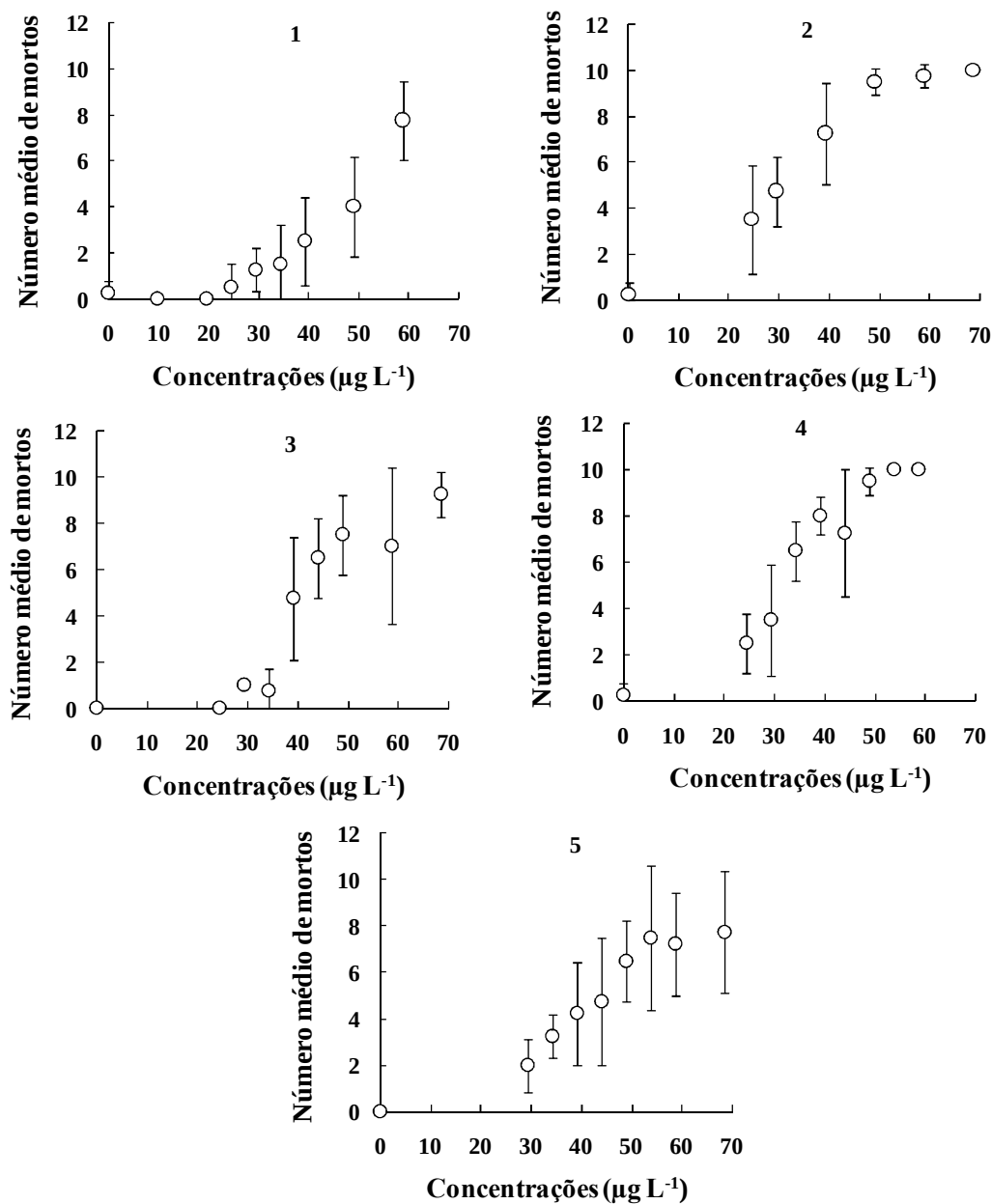


Figura 10 – Número médio de fêmeas de *Tisbe biminiensis* mortas em função da concentração de tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$) nos cinco bioensaios com 48 h de duração. As barras de erro em cada concentração representam ± 1 desvio padrão.

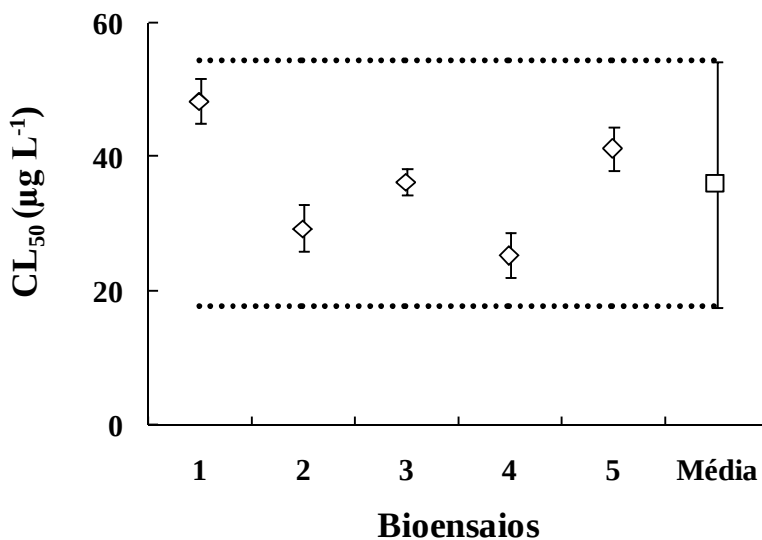


Figura 11 – Registro das CL₅₀-48h do tributilestanho ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$) para as fêmeas de *Tisbe biminiensis* obtidas em cada bioensaio e a média das mesmas. As barras de erro em torno das CL₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CL₅₀ média, as barras de erro representam ± 2 desvios padrões.

Tabela 5 - Comparação dos pares das CL₅₀-48h pela fórmula proposta por Sprague e Fogels (1976). Valores positivos indicam diferença entre pares de CL₅₀-48h.

Par de Bioensaios	Parâmetro Z	Parâmetro H	Diferença (Z - H)
1 e 2	1.65	1.15	0.50
1 e 3	1.33	1.09	0.24
1 e 4	1.91	1.16	0.75
1 e 5	1.17	1.11	0.06
2 e 3	1.24	1.14	0.10
2 e 4	1.16	1.20	-0.04
2 e 5	1.40	1.16	0.25
3 e 4	1.44	1.15	0.28
3 e 5	1.13	1.10	0.03
4 e 5	1.63	1.17	0.46

4.5 DISCUSSÃO

As CL_{50} -48h do TBT para *T. biminiensis* variaram de 25 a 48 $\mu\text{g L}^{-1}$ e esta baixa variação está relacionada à padronização dos bioensaios segundo metodologia inicialmente proposta por Araújo-Castro *et al.* (2009). A análise das CL_{50} -48h através da fórmula proposta por Sprague e Fogels (1976), entretanto, demonstrou que algumas CL_{50} diferiram significativamente entre os bioensaios. Esta comparação das CL_{50} permite destacar os fatores responsáveis pela variação da sensibilidade dos organismos entre os bioensaios: 1) fatores experimentais, tais como variações na salinidade e temperatura de incubação dos organismos; 2) fatores relacionados à origem de organismos coletados no ambiente natural e 3) fatores relacionados ao estado fisiológicos dos organismos cultivados em laboratório. Estes três fatores podem aumentar a variabilidade dos resultados de bioensaios de laboratório, mesmo sob condições padronizadas (SOSNOWSKI *et al.*, 1979; KWOK e LEUNG, 2005; BEATRICI *et al.*, 2006; RUBAL *et al.*, 2011). Nos bioensaios com *T. biminiensis*, as variações experimentais foram negligíveis e todos os organismos foram obtidos de cultivos de laboratório. Dessa forma, é possível que a variação das CL_{50} , e conseqüentemente da sensibilidade dos organismos, esteja relacionada à variação no estado fisiológico dos mesmos.

A sensibilidade dos organismos pode ser definida como a capacidade de resposta a estressores ambientais (e.g., poluentes) mantendo suas propriedades vitais. Estas respostas integram mecanismos de detoxificação, mecanismos fisiológicos e aspectos relacionados à sua ecologia (LAURITANO *et al.*, 2012). A fisiologia e a capacidade de detoxificação dos organismos podem ser relacionadas à sua dieta e tem sido demonstrado que esta pode alterar a sensibilidade dos organismos a poluentes (SOSNOWSKI *et al.*, 1979; BEATRICI *et al.*, 2006). BEATRICI *et al.* (2006) reportaram que a CE_{50} -48h do dicromato de potássio para *D. magna* variou de 0,43 a 1,78 mg L^{-1} em função da dieta dos organismos. Para *T. biminiensis*, ainda não foi quantificado o efeito da dieta sobre a sensibilidade dos organismos a poluentes. Apesar disso, o efeito da dieta foi avaliado sobre o teor e o perfil de ácidos graxos de *T. biminiensis* (LIMA *et al.*, 2013). LIMA *et al.* (2013) reportaram que o teor médio de lipídeos em organismos adultos de *T. biminiensis* foi 35%, com variações significativas em função da dieta (e.g., em organismos alimentados com ração o teor de lipídeos foi 32% e em organismos alimentados com ração e microalgas o teor foi 38%). O teor de lipídeos deve ser considerado quando se avalia a toxicidade de poluentes orgânicos, visto que pode modificar os fatores de bioconcentração destes compostos e influenciar os parâmetros de toxicidade (e.g., CL_{50}) (HICKIE *et al.*, 1989; RISTOLA, 1995). A hipótese utilizada no presente trabalho relacionando a variabilidade da CL_{50} do TBT ao estado fisiológico dos organismos deve ser futuramente testada com outros compostos orgânicos.

T. biminiensis foi menos sensível ao TBT relativamente a outras espécies de copépodos bentônicos incluindo *T. battagliai*, *N. spinipes* e *T. japonicus* (Tab. 6). As espécies bentônicas, entretanto, aparentam ser menos sensíveis ao TBT relativamente às espécies planctônicas tais como *P. marinus*, *A. tonsa*, *E. affinis* e *S. poplesia* (Tab. 6). Para comparar a sensibilidade das espécies bentônicas e planctônicas ao TBT foi construída a curva de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE) com os dados reportados na Tabela 6 (Fig. 12). A DSE não apresenta uma distribuição homogênea das espécies entre os percentis e as espécies bentônicas ocupam os percentis acima de 50% (Fig. 12). Dessa forma, a DSE indica que as espécies bentônicas são menos sensíveis ao TBT que as planctônicas. Este resultado contrasta com a conclusão reportada por DI TORO *et al.* (1991). DI TORO *et al.* (1991), ao analisarem as CL_{50} de vários poluentes agrupando diferentes espécies de água salgada, concluíram que as espécies bentônicas foram tão sensíveis quanto as planctônicas, principalmente devido a dispersão de sensibilidade das espécies epibentônicas. A análise feita no presente estudo foi mais sensível que a reportada por DI TORO *et al.* (1991) e deve ser conduzida para cada poluente, agrupando-se medidas no menor nível taxonômico possível (no presente estudo foram consideradas CL_{50} apenas para Classe Copepoda).

A diferença na sensibilidade das espécies de copépodos bentônicos e planctônicos pode estar relacionada a três fatores: (1) mecanismos de detoxificação mais eficientes nas espécies bentônicas, visto que usualmente estas são expostas a maiores concentrações de compostos hidrofóbicos tal como o TBT; (2) diferenças filogenéticas entre as espécies planctônicas (Ordem Calanoida) e bentônicas (Ordem Harpacticoida) (DI TORO *et al.*, 1991) e (3) diferenças ecológicas entre as espécies, tais como resistência às variações ambientais, hábito oportunista (e.g., espécies do gênero *Tisbe*) e atividade metabólica (GOLLASCH *et al.*, 2000).

As CL_{50} medianas do TBT para os copépodos planctônicos e bentônicos foram 0,86 e 7,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, classificando este poluente como extremamente tóxico para os copépodos (GESAMP, 2002). Ao se aplicar a fórmula estabelecida pela USEPA (EPA, 2003b), utilizada para derivar critérios de qualidade da água, às médias geométricas das CL_{50} (Fig. 12), obtém-se um critério de máxima concentração (CMC) igual a 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$. Considera-se que esta concentração protege os copépodos de efeitos agudos (EPA, 2003b). O CMC foi maior que os limites estabelecidos em critérios de qualidade de água exigentes como o estabelecido pela *Commission of European Communities* (0,0002 $\mu\text{g L}^{-1}$, CEC, 2006) e pelo *Canadian Council of Ministers of Environment* (0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$, CCME, 1999). Em contraste, o CMC foi menor que os limites estabelecidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente para águas salinas de classe II (0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$, CONAMA, 2005) e pela *United States Environmental Protection Agency* (0,42 $\mu\text{g L}^{-1}$, EPA, 2003a). Dessa forma, os limites estabelecidos pelo CONAMA e pela USEPA podem não ser adequados para proteção de populações de copépodos planctônicos e bentônicos.

Tabela 6 - Comparação da sensibilidade de *Tisbe biminiensis* com outras espécies de copépodos. **CL₅₀**: concentração letal a 50% dos organismos; **CENO**: concentração de efeito não observado; **CEO**: concentração de efeito observado. Todos os valores em $\mu\text{g TBT L}^{-1}$.

Espécie	Estágio	CL ₅₀ ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$)	CENO ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$)	CEO ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$)	Tempo de exposição (dias)	Referência
Copépodos bentônicos						
<i>Tisbe biminiensis</i>	Adulto	36	29	34	2	Este estudo
<i>Tisbe battagliai</i>	Copepodito	17	15	21	2	Macken et al. (2008)
<i>Nitocra spinipes</i>	Adulto	1,96			4	Linden et al. (1979)
	Adulto	12,7			4	Karlsson et al. (2006)
	Adulto	1,88			4	Linden et al. (1979)
<i>Tigriopus japonicus</i>	Adulto	50	20		4	Lee et al. (2007)
	Adulto	18			4	Bao et al. (2011)
	Adulto	0,85			2	Ara et al. (2010)
	Adulto	0,51			2	Ara et al. (2010)
	Adulto	0,15	0,12		4	Kwok e Leung (2005)
Copépodos planctônicos						
<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	Adulto	1,2			2	Huang et al. (2006)
	Adulto	0,55			4	Huang et al. (2006)
<i>Schmackeria poplesia</i>	Adulto	0,41			4	Huang et al. (2010)
<i>Eurytemora affinis</i>	Subadulto	2,2			2	Hall et al. (1988)
	Subadulto	1,4			2	Bushong et al. (1988)
	Subadulto	2,5			2	Bushong et al. (1988)
	Subadulto	0,6			3	Bushong et al. (1988)
	Subadulto	0,5			3	Bushong et al. (1988)
<i>Acartia tonsa</i>	Subadulto	0,6			3	Hall et al. (1988)
	Adulto	2,94			1	U'ren et al. (1983)
		2			3	U'ren et al. (1983)
		0,98			4	U'ren et al. (1983)
		0,74			5	U'ren et al. (1983)
		0,54			6	U'ren et al. (1983)
	Adulto	0,24			2	Kusk e Petersen (1997)
	Subadulto	1,1			2	Bushonh et al. (1988)

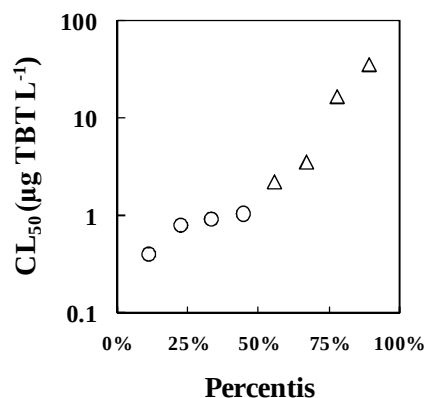


Figura 12 – Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE) de copépodos ao tributilestano ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$). Os círculos representam as espécies planctônicas e os triângulos as espécies bentônicas. Cada ponto equivale à média geométrica para cada espécie de copépodo. As médias geométricas foram calculadas a partir dos dados reportados na Tabela 6.

Apesar dos copépodos bentônicos serem menos sensíveis ao TBT, houve uma elevada variabilidade nas CL_{50} reportadas para estas espécies (Tab. 6). Para *N. spinipes*, a variação entre as CL_{50} -96h foi de 112%, enquanto para *T. japonicus* a variação na CL_{50} -96h foi de 111%. Em contraste, não houve elevada variação nas CL_{50} reportadas para as espécies de copépodos planctônicos. Esta variação sugere que apenas o hábito bentônico não é determinante para definir a sensibilidade dos organismos a poluentes. Outros fatores como o local de coleta dos organismos e as condições de cultivo podem tornar copépodos bentônicos tão sensíveis quanto os planctônicos (e.g., *T. japonicus*, cuja CL_{50} -96h para o TBT foi $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) (Tab. 6). Esta hipótese é corroborada pelos resultados reportados por RUBAL *et al.* (2011) para bioensaios com o copépodo bentônico *Paronychocamptus nanus*. A CL_{50} -96h do cobre para *P. nanus* variou em função do local de coleta dos organismos (de 49 a $175 \mu\text{g L}^{-1}$ para organismos coletados em região não contaminada e contaminada, respectivamente, com cobre) (RUBAL *et al.*, 2011).

Os copépodos absorvem rapidamente poluentes orgânicos (e.g., DDT, dioxinas) a partir da água e do alimento (WANG e WANG, 2005; ZHANG *et al.*, 2011). A via de absorção preponderante depende do poluente e do organismo considerado. As taxas de absorção do TBT pelos copépodos ainda não foram reportadas na literatura, entretanto, é possível que a alimentação (e.g., microalgas, bactérias) seja a via de absorção preponderante (COELHO *et al.*, 2002b). Apesar desta preponderância, a alimentação como via de exposição não foi considerada nos bioensaios de exposição dos copépodos ao TBT. A ausência de alimentação objetivou a manutenção das concentrações nominais, que podem ser reduzidas devido à fotólise e/ou biodegradação pelas microalgas (READER e PELLETIER, 1992; TSANG *et al.*, 1999). Teste preliminar com o copépodo *T. biminiensis* (não reportado nesta dissertação) demonstrou que a CL_{50} -48h foi drasticamente reduzida quando microalgas foram adicionadas como alimento no bioensaio. Isto indica que alimentação aumentou consideravelmente a concentração interna de TBT em *T. biminiensis*. Os bioensaios com *T. biminiensis* foram conduzidos sem alimentação para permitir a comparação dos resultados com os registros da literatura e para garantir a manutenção das concentrações nominais de TBT.

A ausência de alimentação prejudica o realismo dos bioensaios, subestima a potência de um poluente e pode confundir a interpretação dos resultados (ANKLEY *et al.*, 1994). Por exemplo, a ausência de alimentação compromete o estado nutricional dos copépodos, mesmo em curtos períodos de exposição. Nos bioensaios com fêmeas ovígeras de *T. biminiensis* foi observado que, com 48 h sem alimentação, os organismos ficam despigmentados e podem perder seus sacos ovígeros. Estas observações são coerentes com o balanço energético dos copépodos, que podem alocar 49% da energia para sua própria sobrevivência e 42% para reprodução (LEE e YAN, 1994). A despigmentação dos organismos sob estresse alimentar está relacionada à redução no teor de lipídeos e, além de prejudicar a contagem dos mortos ao final do experimento, reduz a bioacumulação de contaminantes (MAGNUSSON e TISELIUS, 2010). Ao final dos bioensaios com *T. biminiensis* foi observado que as fêmeas ovígeras mortas foram atacadas pelos náuplios e

este comportamento provavelmente foi causado pela ausência de alimento nos recipientes-testes.

O TBT é várias ordens de magnitude mais tóxico para *T. biminiensis* do que a amônia (CL_{50} -48h de $12060 \mu\text{g L}^{-1}$) e o cromo (CL_{50} -48h de $7510 \mu\text{g L}^{-1}$) (ARAUJO, 2005; ARAUJO-CASTRO *et al.*, 2009). A razão CL_{50} -24h/ CL_{50} -48h média igual a 1 para o TBT sugere que as fêmeas de *T. biminiensis* rapidamente absorveram este poluente. Em contraste, esta razão para a amônia foi 2,3 e a razão CL_{50} -48h/ CL_{50} -72h para o cromo foi 1,6 em bioensaios com *T. biminiensis*. A comparação das razões sugere que *T. biminiensis* absorve o TBT mais rapidamente que a amônia e o cromo. A natureza lipofílica do TBT ($\log K_{ow} = 3,74$) e o elevado teor de lipídeos em *T. biminiensis* (~35% peso seco) podem ter facilitado a absorção do TBT (LAUGHLIN *et al.*, 1986; LIMA *et al.*, 2013). Como consequência, o TBT parece alcançar o estado de equilíbrio dinâmico em *T. biminiensis* dentro de 24 h após a exposição, enquanto que para amônia e cromo este tempo é maior que 72 h. A razão entre as CL_{50} de TBT varia entre diferentes espécies de copépodos (Fig. 13). Estas variações podem estar relacionadas a diferenças nas taxas de absorção (k_u) e eliminação (k_e) entre as espécies, resultando em diferenças nos fatores de bioconcentração (FENT e LOOSER, 1995). De forma geral, nos copépodos o tempo para se alcançar o equilíbrio dinâmico do TBT é menor do que nos anfípodos (MEADOR, 1997). MEADOR (1997) reportou que nos anfípodos o tempo para atingir o equilíbrio dinâmico pode ser maior do que 10 dias. A absorção mais rápida do TBT nos copépodos relativamente aos anfípodos pode estar relacionada à maior relação área superficial-volume e maiores taxas metabólicas nos copépodos (MCGEE *et al.*, 1998).

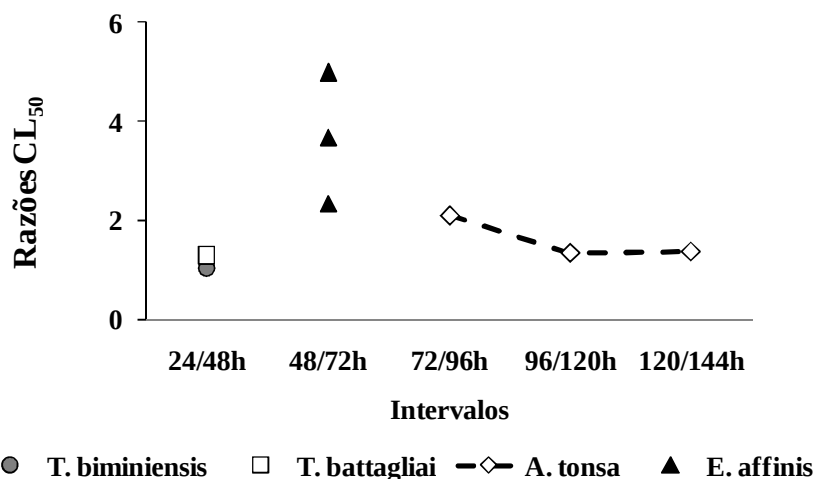


Figura 13 – Razões entre CL_{50} de TBT para quatro espécies de copépodos: *Tisbe biminiensis* – este estudo; *Tisbe battagliai* - MACKEN *et al.* (2008); *Acartia tonsa* - U'REN *et al.* (1983); *Eurytemora affinis* - BUSHONG *et al.* (1988) e HALL *et al.* (1988).

Nos sistemas biológicos, o TBT tem um modo de ação específico: interfere na síntese mitocondrial de ATP. Devido a isso, o TBT é descrito como um desacoplador da fosforilação oxidativa (HOLLINGWORTH *et al.*, 2001). Devido à sua natureza lipofílica, o TBT pode atravessar a membrana celular e se acumular nos depósitos de lipídeos da célula (LEE, 1991; ORTIZ *et al.*, 2005). Dentro da célula, o cátion TBT^+ pode formar complexos com ligantes contendo átomos de O, N, P ou S (PELLERITO e NAGY, 2002). Em nível celular, os efeitos do TBT consistem na inibição da bomba de Ca^{2+} e inibição da síntese protéica e de DNA (GIRARD *et al.*, 1997). Estes efeitos podem desencadear a morte celular e comprometer a replicação celular (GIRARD *et al.*, 1997; HOLLINGWORTH *et al.*, 2001).

Para evitar danos aos sistemas biológicos, os organismos desenvolveram defesas contra poluentes. Para poluentes altamente hidrofóbicos, o sistema de defesa consiste de reações enzimáticas para facilitar a eliminação dos mesmos, conhecidas como reações de fase I e fase II (LAURITANO *et al.*, 2012). As reações de fase I dependem do sistema de enzimas da família P450 e, por este sistema, radicais hidroxila (-OH) podem ser ligados à molécula. Posteriormente, as reações de fase II conjugam açúcares, sulfatos ou peptídeos para facilitar a excreção dos poluentes (LEE, 1991). Em copépodos, os mecanismos de detoxificação de poluentes orgânicos têm sido elucidados através do sequenciamento genético e da indução da transcrição genética (HAKIMZADEH e BRADLEY, 1990; LEE *et al.*, 2006; HANSEN *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2011; LAURITANO *et al.*, 2012). KIM *et al.* (2011) apresentaram o primeiro registro do sistema de detoxificação de copépodos após exposição ao TBT. Neste trabalho foi quantificada a expressão da enzima superóxido dismutase em *T. japonicus* após exposição a concentrações entre 1 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Houve inibição desta enzima em concentrações maiores que 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. LEE *et al.* (2006) reportaram a expressão da enzima glutationa-S-transferase após exposição de *T. japonicus* a octilfenol e PCB. HANSEN *et al.* (2008) reportaram a expressão da mesma enzima após exposição de *Calanus finmarchicus* a naftaleno. Os resultados reportados por KIM *et al.* (2011) sugerem que os compostos de TBT podem aumentar as concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio, que em altas concentrações desnaturam proteínas e prejudicam as demais macromoléculas biológicas (LAURITANO *et al.*, 2012). As análises em nível de sistemas de detoxificação expõem a grande variabilidade entre as espécies de copépodos, pois mesmo fatores como teores de lipídeos no organismo podem afetar esses sistemas (HANSEN *et al.*, 2009). A complexa relação existente entre o estado fisiológico dos organismos e a eficiência dos sistemas de detoxificação poderia explicar a variabilidade reportada para as CL_{50} do TBT entre as espécies de copépodos.

O aumento nas concentrações intracelulares das espécies reativas de oxigênio após exposição a poluentes pode desnaturar as proteínas nas membranas celulares e, por isso, outra resposta tem sido a produção de proteínas de choque de calor (HAKIMZADEH e BRADLEY, 1990). Esta é uma resposta homeostática e consiste na produção de proteínas específicas após estresse promovido por altas temperaturas, poluentes ou agentes infecciosos. HAKIMZADEH e BRADLEY (1990) reportaram a produção de proteínas de

choque após exposição do copépodo *Eurytemora affinis* ao TBT na faixa de 0,025 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, contudo não elucidaram os mecanismos pelos quais esta produção protegeria *E. affinis* do contaminante.

Resumindo os principais tópicos discutidos neste capítulo, pode-se afirmar que *T. biminiensis* foi agudamente sensível ao TBT dissolvido na água com $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ média de 36 $\mu\text{g L}^{-1}$. As $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ variaram significativamente entre os bioensaios e isto pode estar relacionado às variações no estado fisiológico dos organismos, condicionado pelas condições de cultivo. Os copépodos bentônicos são menos sensíveis ao TBT relativamente aos planctônicos. Em concentrações de TBT menores que 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$, as populações de copépodos não devem sofrer efeitos agudos. Esta concentração é menor que alguns critérios de qualidade da água (e.g, estabelecidos pelo CONAMA e pela USEPA), que dessa forma podem não proteger populações de copépodos. *T. biminiensis* absorve o TBT mais rapidamente do que a amônia e o cromo.

5. CAPÍTULO 3

**TOXICIDADE DO TRIBUTILESTANHO (TBT) ADSORVIDO AO
SEDIMENTO PARA O COPÉPODO BENTÔNICO *TISBE BIMINIENSIS***

5.1 RESUMO

O sedimento representa uma fonte importante de contaminantes para organismos bentônicos, seja através da água intersticial ou pela ingestão de detritos orgânicos. O objetivo deste capítulo foi avaliar a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento para o copépodo bentônico *T. biminiensis*. As concentrações de TBT foram escolhidas na faixa entre 1,6 e 39,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u. baseadas na $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ obtida nas exposições aquosas. Foi avaliada a toxicidade letal e sub-letal (efeito sobre a fecundidade total) do TBT em bioensaios com 96 h de duração. Foi também avaliado o efeito da liofilização sobre os parâmetros de toxicidade. As $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ e $\text{CE}_{50-96\text{h}}$ médias na fração úmida foram 31 e 5,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u., respectivamente. As concentrações de TBT em sedimentos da região costeira do Brasil são próximas às concentrações de efeito do TBT reportadas para *T. biminiensis*. Quando comparada à $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ das exposições aquosas, a toxicidade do TBT na fração lamosa se ajustou à predição feita a partir da teoria de equilíbrio de partição. *T. biminiensis* foi mais sensível ao TBT adsorvido à fração lamosa do que outros organismos. Na fração liofilizada, a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ após 10 dias de estocagem foi de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u., entretanto observou-se um aumento na $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ após 30 dias de estocagem. A $\text{CE}_{50-96\text{h}}$ média na fração liofilizada foi 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u. A vantagem da liofilização foi a redução na variabilidade das $\text{CL}_{50-96\text{h}}$, entretanto esta técnica possui a desvantagem de eliminar gradientes físico-químicos do sedimento e pode prejudicar o realismo dos bioensaios.

5.2 INTRODUÇÃO

Os sedimentos são a matriz onde se concentram poluentes orgânicos como os organoestênicos (e.g., TBT) (BURTON *et al.*, 2002). Concentrações elevadas de TBT nos sedimentos já foram reportadas na América do Sul (6.500 $\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ p.s.) (CASTRO *et al.*, 2012a), Austrália (340.000 $\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ p.s.) (NEGRI e MARSHALL, 2009) e na região Mediterrânea (18.722 $\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ p.s.) (DÍEZ *et al.*, 2002), confirmando a difusa poluição marinha por TBT.

A partição do TBT para os sedimentos a partir da coluna d'água (K_d) é governada por parâmetros como salinidade e pH da água do mar (BANGKEDPHOL *et al.*, 2009) e também pelas propriedades do sedimento (e.g., conteúdo orgânico) (HOCH e SCHWESIG, 2004). HOCH e SCHWESIG (2004) reportaram um aumento no $\log K_d$ de 1,7 para 3,43 L kg^{-1} com um enriquecimento orgânico do sedimento de somente 5%. Esta partição e o balanço adsorção/desorção tornam-se importantes para organismos bentônicos, pois determinarão quais são as vias de exposição dos organismos a este poluente: (1) alimentação baseada em detritos orgânicos e/ou captura de partículas do sedimento ou (2) absorção a partir da água intersticial (COELHO *et al.*, 2002a).

Organismos bentônicos são ótimos modelos para avaliar a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento, pois bioacumulam este contaminante a partir do sedimento e da água intersticial (LOTUFO, 1998b). A toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento foi avaliada para anfípodos, poliquetas (MEADOR *et al.*, 1997), equinodermos (STRONKHORST *et al.*, 1999), moluscos (COELHO *et al.*, 2002a) e ao nível de comunidades bentônicas (AUSTEN e MCEVOY, 1997). Para copépodos bentônicos, a avaliação da toxicidade do TBT considerou principalmente a água como via de exposição (KWOK e LEUNG, 2005; ARA *et al.*, 2010), sendo essencial avaliar a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento (LOTUFO, 1997; LOTUFO, 1998b; a).

Para avaliar a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento várias estratégias são aplicadas: (1) coleta de sedimentos contaminados por TBT para submetê-los a bioensaios em laboratório (CHEUNG *et al.*, 2003); (2) transplante de organismos para regiões contaminadas a fim de avaliar efeitos *in situ* (MORCILLO e PORTE, 2000); (3) avaliação de efeitos (e.g., frequência de imposex) em populações silvestres (BIGATTI *et al.*, 2009); e (4) fortificação de amostras livres de TBT para estabelecer as curvas dose-efeito (MEADOR *et al.*, 1997). Nas estratégias 1 e 4, freqüentemente são necessárias manipulações do sedimento para prepará-lo para os bioensaios (e.g., peneiramento, fortificação, estocagem) (ASTM, 2003). Estas manipulações alteram as características do sedimento e podem dificultar a interpretação dos resultados dos bioensaios (ANKLEY *et al.*, 1994).

O peneiramento do sedimento antes dos bioensaios é essencial para remoção de organismos indígenas (ASTM, 2003), contudo pode interferir na partição dos contaminantes (DAY *et al.*, 1995; FISHER *et al.*, 2004). DAY *et al.* (1995) reportaram redução de 70% nas concentrações de PCB após peneiramento por malha de 250 μm . Para remoção dos organismos indígenas outras manipulações foram avaliadas, como autoclavagem, congelamento, exposição à radiação ionizante e liofilização do sedimento (BEIRAS e HIS, 1995; DAY *et al.*, 1995; GEFFARD *et al.*, 2004). Apesar de necessárias, todas elas modificam a toxicidade do sedimento.

A fortificação do sedimento (em inglês, *spiking*) consiste na adição de compostos químicos à matriz para avaliação de efeitos experimentais (e.g., toxicidade) (ASTM, 2003). Três fatores importantes devem ser considerados: (1) preparo do sedimento (úmido ou seco); (2) adição experimental, considerando a escolha do solvente orgânico e o método para fortificação; e (3) homogeneização do sedimento fortificado (NORTHCOTT e JONES, 2000b). As condições ótimas dependem do contaminante utilizado (MURDOCH *et al.*, 1997; NORTHCOTT e JONES, 2000a), contudo variações nos três fatores acima podem afetar a eficiência da fortificação (BURTON *et al.*, 2006) e conseqüentemente os resultados dos bioensaios. O objetivo deste capítulo foi avaliar a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento utilizando o copépodo bentônico *T. biminensis* como organismo-teste. O efeito da liofilização sobre a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento foi também avaliado.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Coleta do sedimento

Sedimento superficial foi coletado no manguezal do estuário do rio Maracaípe (Pernambuco, Brasil) na maré baixa. Neste estuário não existem marinas e portos instalados, podendo ser considerado como um ambiente prístino (ARAUJO-CASTRO *et al.*, 2009). O sedimento foi coletado com auxílio de colher de aço inoxidável e armazenado em recipientes de vidro. Estes recipientes foram refrigerados em caixa térmica com gelo para transporte até o laboratório. No laboratório, os recipientes foram mantidos refrigerados a 4 °C. Antes de cada bioensaio, amostras do sedimento foram peneiradas em malha de 64 µm para remoção de organismos da meiofauna. A fração lamosa (< 64 µm composta por silte e argila) foi escolhida para os bioensaios por concentrar os compostos organoestânicos (ABALOS *et al.*, 1997; ARAMBARRI *et al.*, 2003). Para esterilizar o sedimento, alíquotas de 100 g da fração lamosa foram autoclavadas a temperatura de 120-127 °C e pressão entre 1 e 1,5 atm por 40 min (CHANDLER, 1986). O sedimento autoclavado foi resfriado em temperatura ambiente e, quando necessário, refrigerado a 4 °C até o início dos bioensaios.

5.3.2 Preparo das soluções de TBT e fortificação da fração lamosa

Uma solução estoque do TBTO (obtido da Sigma-Aldrich, pureza 96% e densidade relativa de 1,17 g mL⁻¹ a 25 °C) foi preparada em acetona com concentração de 490 µg TBT mL⁻¹ (Fig. 14). Para estimar as concentrações de efeito do TBT adsorvido ao sedimento foram escolhidas concentrações para as soluções trabalho a partir da CL₅₀-48h média do TBT dissolvido na água (~36 µg L⁻¹ – ver capítulo anterior). A partir dessa informação foram preparadas soluções trabalho entre 16 e 392 µg TBT mL⁻¹. A fortificação da fração lamosa com TBT foi feita adicionando-se 1 mL de cada solução trabalho em 10 g de lama úmida (ASTM, 2003). Dessa forma, as concentrações trabalho variaram entre 1,6 e 39,2 µg TBT g⁻¹ de peso úmido (Fig. 14). Após fortificação, a lama foi extensivamente homogeneizada com auxílio de bastão de vidro. Para assegurar a completa sorção do TBT à fase particulada e evaporação da acetona, a lama homogeneizada foi mantida em repouso (envelhecida) por 24 h a 25 °C sem exposição à luz (BURTON *et al.*, 2006). Este intervalo é suficiente para assegurar o equilíbrio de partição do TBT entre o sedimento e a água intersticial em sedimentos estuarinos (UNGER *et al.*, 1988). Em cada bioensaio foram feitos os tratamentos controle (sem adição de acetona à fração lamosa) e controle do solvente (com adição de 1 mL de acetona – concentração de 0,1 mL g⁻¹). A concentração de acetona foi determinada a partir de bioensaios prévios com *T. biminiensis*. Para cada concentração foram feitas três réplicas com 10 g de sedimento. O controle e o controle do solvente foram homogeneizados e envelhecidos da mesma forma que a lama fortificada.

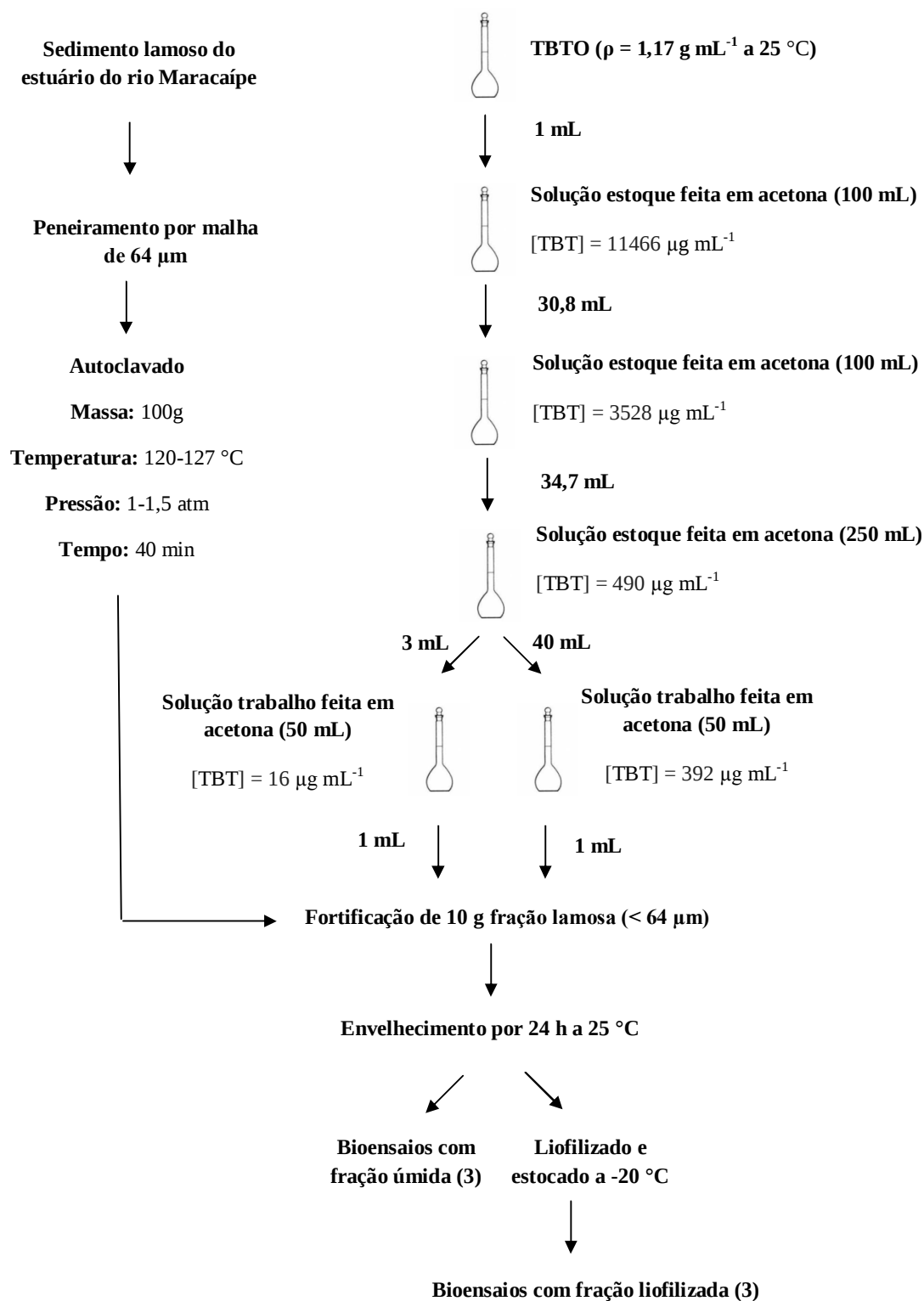


Figura 14 - Esquema para preparo do sedimento, das soluções estoque e trabalho, bem como a fortificação e envelhecimento da fração lamosa utilizada nos bioensaios com *Tisbe biminiensis*.

Três bioensaios foram realizados para estimar as concentrações de efeito do TBT adsorvido à fração lamosa úmida.

5.3.3 *Determinação do peso seco e teor orgânico do sedimento*

Em cada réplica foram determinados gravimetricamente o peso seco e o teor orgânico da lama, calculando-se o percentual médio para cada tratamento. Para determinar o peso seco, 4 g de cada réplica foram secas em estufa a 60 °C por 24 h. Para determinar o teor orgânico, 1 g da lama seca foi muflada a 450 °C por 6 h (WANG *et al.*, 2011b). O peso seco e o conteúdo inorgânico da lama foram calculados pela seguinte fórmula (MIRANDA e YOGUI, 2012):

$$\text{PS ou C} = \frac{(P_f - P_r)}{(P_i - P_r)} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

PS ou C: peso seco (PS) ou conteúdo inorgânico (C) na lama (%)

P_f: peso final após secagem na estufa ou combustão na mufla, correspondendo ao peso da lama mais o peso do recipiente (g)

P_i: peso inicial antes da secagem na estufa ou combustão na mufla, correspondendo ao peso da lama mais o peso do recipiente (g)

P_r: peso do recipiente (g)

O teor orgânico (TO, %) na lama seca foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{TO (\%, p. s.)} = 100 - \text{C} \quad (\text{Eq. 5})$$

O TO (%) na lama úmida foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{TO (\%, p. u.)} = \frac{\text{TO (\%, p.s.)}}{100} \times \text{PS} \quad (\text{Eq. 6})$$

5.3.4 Efeito da liofilização sobre a toxicidade da fração lamosa

O efeito da liofilização sobre a toxicidade do TBT adsorvido à fração lamosa foi avaliado após estimarem-se as concentrações de efeito (e.g, CL₅₀ e CE₅₀) do poluente em lama úmida. A fração lamosa úmida foi autoclavada, fortificada e envelhecida nas mesmas condições descritas acima (Fig. 14). A fortificação do sedimento úmido foi realizada com concentrações entre 2,9 e 39,2 µg TBT g⁻¹ de peso úmido. Após envelhecimento (repouso da fração fortificada por 24 h a 25 °C), a fração lamosa foi liofilizada e as amostras secas foram armazenadas em freezer a -20 °C antes do início dos bioensaios. O controle e o controle do solvente foram preparados conforme descrito anteriormente. Para os controles e para cada concentração de trabalho foram feitas três réplicas. Três bioensaios foram realizados para estimar o efeito da liofilização sobre a toxicidade do TBT adsorvido à fração lamosa. Como as amostras liofilizadas ficaram armazenadas em freezer, avaliou-se também o efeito do tempo da estocagem das mesmas sobre as concentrações de efeito. Dessa forma, sub-amostras de cada réplica foram retiradas 10, 20 e 30 dias após a liofilização. O efeito sobre a fecundidade total de *T. biminiensis* foi avaliado apenas após 20 e 30 dias de liofilização. O peso seco e o teor orgânico da fração liofilizada foram estimados em cada réplica no primeiro bioensaio (após 10 dias de liofilização) conforme descrito acima.

5.3.5 Bioensaios com *T. biminiensis*

O copépodo bentônico *T. biminiensis* vive associado a macroalgas bentônicas e a sedimentos arenosos (VOLKMANN-ROCCO, 1973). Em laboratório, os cultivos de *T. biminiensis* foram estabelecidos em meio livre de substrato (SOUZA-SANTOS *et al.*, 2006), contudo esta espécie adapta-se a substratos com diferentes granulometrias (ARAUJO-CASTRO *et al.*, 2009). Os bioensaios com *T. biminiensis* foram realizados conforme metodologia estabelecida por Araújo-Castro *et al.* (2009). Nos bioensaios com a fração lamosa úmida, 2 g de lama de cada tratamento foram colocados em recipientes de vidro, cobrindo totalmente o fundo dos mesmos. Nos bioensaios com lama liofilizada, apenas cerca de 0,4 g foram suficientes para cobrir o fundo dos recipientes. Após adição do substrato, 20 mL de solução algal (concentração de 0,2 µg Chl-a mL⁻¹) da diatomácea *Thalassiosira weissflogii* foram adicionados aos recipientes. A adição da solução algal ressuspendeu a lama e, por isso, um intervalo de 24 h foi necessário para permitir a sedimentação das partículas. Após a sedimentação, 10 fêmeas ovígeras de *T. biminiensis* foram colocadas em cada recipiente. Os bioensaios duraram 96 h, adicionando-se solução algal como alimento no segundo dia de bioensaio, mantendo-se a concentração em 0,2 µg Chl-a mL⁻¹. Ao final

dos bioensaios, as fêmeas foram coradas com Rosa de Bengala e fixadas com formaldeído. Após fixação, foram quantificadas a mortalidade e a fecundidade total (náuplios e copepoditos) das fêmeas ovígeras. Foram consideradas mortas as fêmeas ovígeras mal coradas e com sinais de decomposição das carapaças.

5.3.6 Análise dos dados

A ANOVA foi aplicada para avaliar diferenças significativas no peso seco e no teor orgânico médios entre os bioensaios com a fração lamosa úmida e liofilizada. O teste de Tukey foi aplicado *a posteriori* para identificar as diferenças significativas. A normalidade e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente.

Em todos os bioensaios, as CL₅₀-96h foram estimadas pelo método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON *et al.*, 1977). O teste t para amostras pareadas foi utilizado para avaliar diferenças significativas entre a mortalidade média no controle e no controle do solvente dos 3 bioensaios realizados. A CENO e a CEO foram estabelecidas conforme descrito na subsecção 4.3.4.2 do capítulo 2.

A fecundidade total média das fêmeas no controle e no controle do solvente foi comparada entre os 3 bioensaios pelo teste t para amostras pareadas. Havendo diferenças significativas, foi considerado nos cálculos o controle com a menor fecundidade total média. Em cada concentração foi estimada a redução percentual na fecundidade total média pela seguinte fórmula:

$$R_{\%} = \left| \frac{(F_C - F_S)}{F_S} \right| \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

onde:

R_%: redução percentual na fecundidade total média em determinada concentração

F_C: fecundidade total média em determinada concentração

F_S: fecundidade total média no controle de menor fecundidade

A redução percentual na fecundidade total foi considerada como número de organismos mortos. Estes números foram utilizados para estimar a concentração na qual a fecundidade total das fêmeas foi reduzida em 50% após 96 h de exposição (CE₅₀-96h) pelo método

Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977). A CENO e CEO para a fecundidade total das fêmeas foram estimadas conforme descrito no capítulo anterior. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 0,05.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Caracterização e efeito letal do TBT adsorvido à fração lamosa úmida

Nos bioensaios, o percentual do peso seco médio e o teor orgânico médio da fração lamosa foram $41\% \pm 4\%$ (desvio padrão) e $8,4\% \pm 0,8\%$, respectivamente. Não houve diferenças entre a mortalidade média no controle e no controle do solvente (teste t, $t = 0$, $gl = 2$, $p = 1$). As curvas da mortalidade percentual em função do peso úmido nos três bioensaios estão apresentadas na Figura 15. As CL_{50-96h} médias do TBT adsorvido à fração lamosa em termos de peso úmido, peso seco e matéria orgânica foram $31 \mu g g^{-1}$ p.u., $74 \mu g g^{-1}$ p.s. e $358 \mu g g^{-1}$ m.o., respectivamente (Figura 16). Os coeficientes de variação dessas CL_{50-96h} foram respectivamente 27%, 22% e 28%. As CENO quanto à mortalidade foram 18, 21 e $21 \mu g g^{-1}$ p.u. nos bioensaios 1, 2 e 3, respectivamente (teste de Dunnet, $Q < 8,1$, $p > 0,05$). As CEO foram 21, 25 e $25 \mu g g^{-1}$ p.u. nos bioensaios 1, 2 e 3, respectivamente (teste de Dunnet, $Q > 8,1$, $p < 0,05$).

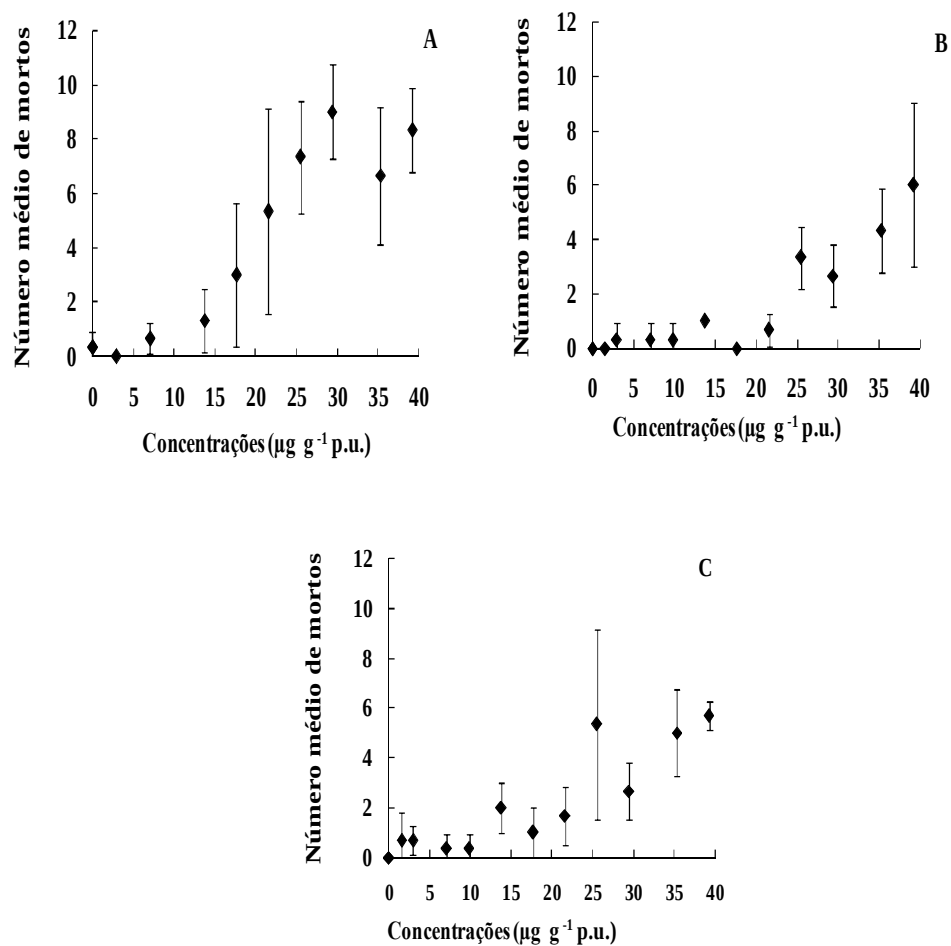


Figura 15 – Número médio de fêmeas de *Tisbe biminiensis* mortas em função das concentrações de tributilestanho (TBT) adsorvido ao sedimento ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.u.) em três bioensaios com 96 h de duração. Os bioensaios 1, 2 e 3 estão representados nos painéis A, B e C, respectivamente. As barras de erro em cada concentração representam ± 1 desvio padrão.

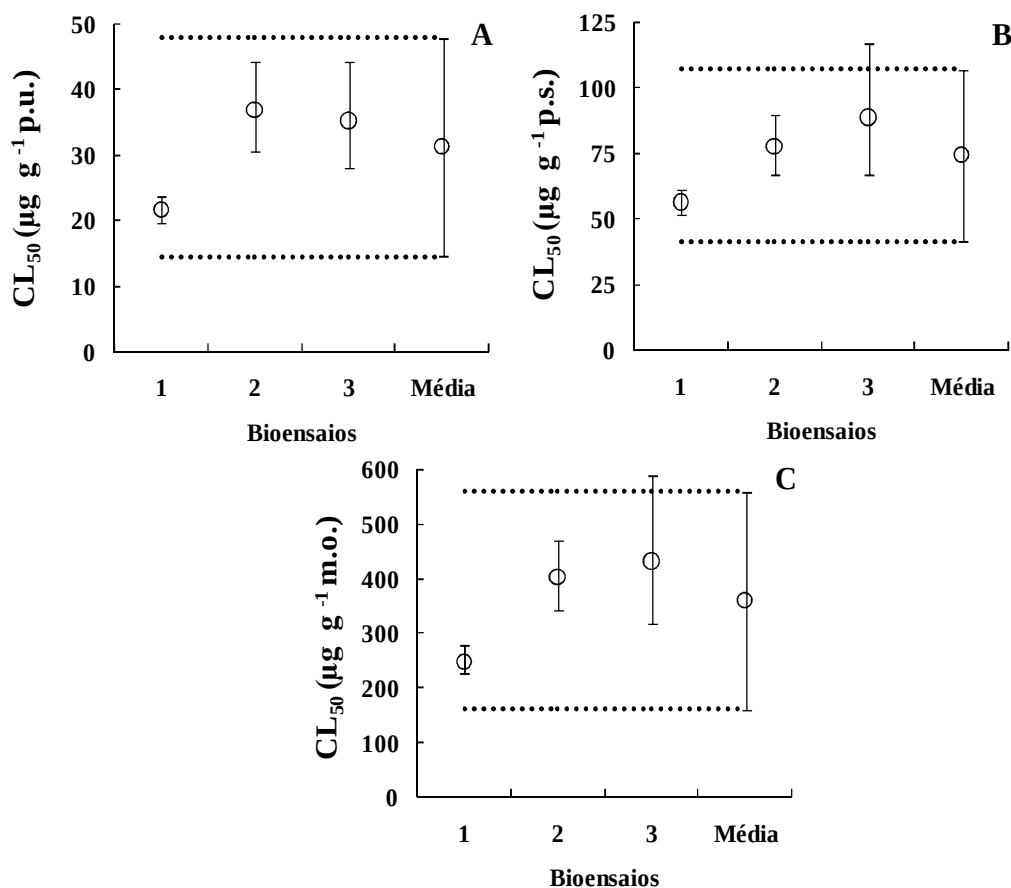


Figura 16 - Registro da CL₅₀-96h do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa úmida para as fêmeas de *Tisbe biminiensis*. Os resultados estão apresentados em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C). As barras de erro em torno da CL₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CL₅₀ média, as barras representam ± 2 desvios padrões.

5.4.2 Efeito sub-letal do TBT adsorvido à fração lamosa úmida

A fecundidade total das fêmeas de *T. biminiensis* foi significativamente menor no controle do solvente relativamente ao controle (teste t, $t = -2,2$, $gl = 16$, $p = 0,03$). Dessa forma, o controle do solvente foi utilizado para estimar a concentração de efeito sobre a fecundidade. A fecundidade média obtida em cada concentração de TBT adsorvido ao sedimento está apresentada na Figura 17. Nos bioensaios 1, 2 e 3 as CENO foram estimadas em $<2,9$, $1,6$ e $2,9 \mu\text{g g}^{-1}$ p.u., respectivamente (teste de Dunnet, $Q < 3$, $p > 0,05$). As respectivas CEO foram $2,9$, $2,9$ e $7 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido (teste de Dunnet, $Q > 3$, $p < 0,05$). As CE₅₀-96h médias para a fecundidade total em termos de peso úmido, peso seco e matéria orgânica foram $5,2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.u., $13 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. e $68 \mu\text{g g}^{-1}$ m.o., respectivamente

(Figura 18). Os coeficientes de variação dessas CE_{50-96h} foram respectivamente 7%, 17% e 21%.

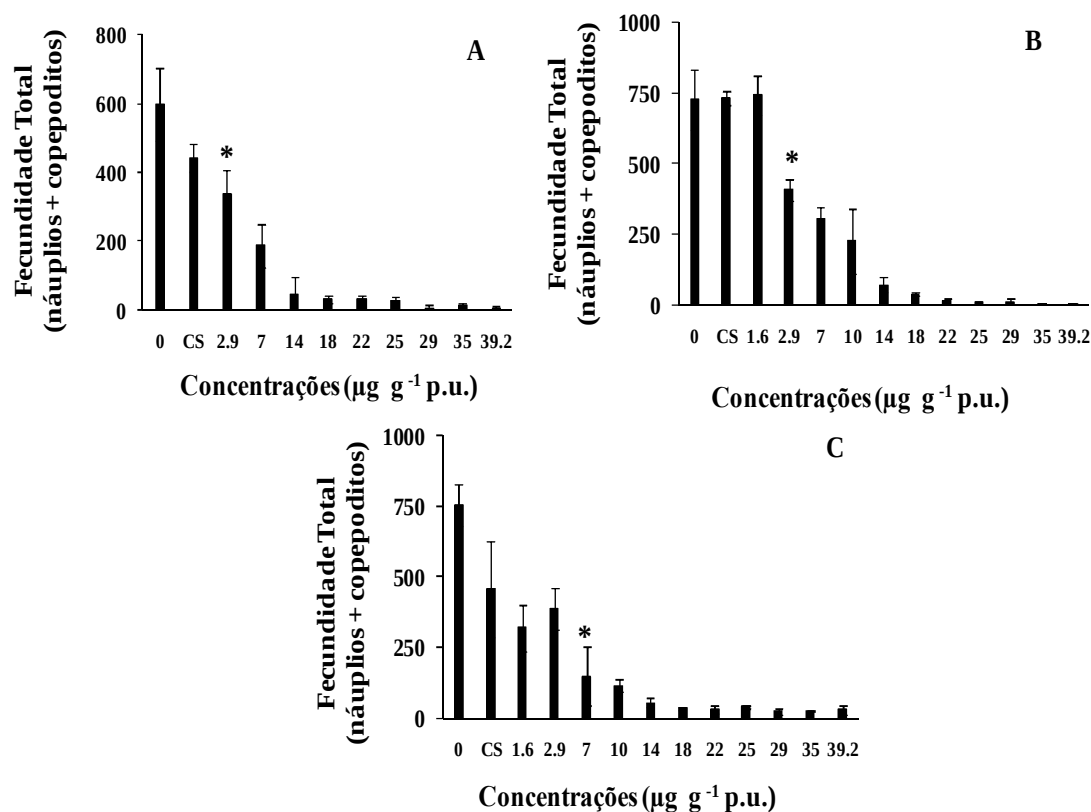


Figura 17 - Efeito de tributilestanho (TBT) adsorvido à lama úmida sobre a fecundidade total média (náuplios + copepoditos) das fêmeas de *Tisbe biminiensis* em três bioensaios de 96 h. Os asteriscos indicam a concentração de efeito observado (CEO) em cada bioensaio. As concentrações 0 e CS representam a fecundidade total no controle e no controle do solvente, respectivamente. As barras de erro em cada concentração representam um desvio padrão. Os bioensaios 1, 2 e 3 estão representados nos painéis A, B e C, respectivamente.

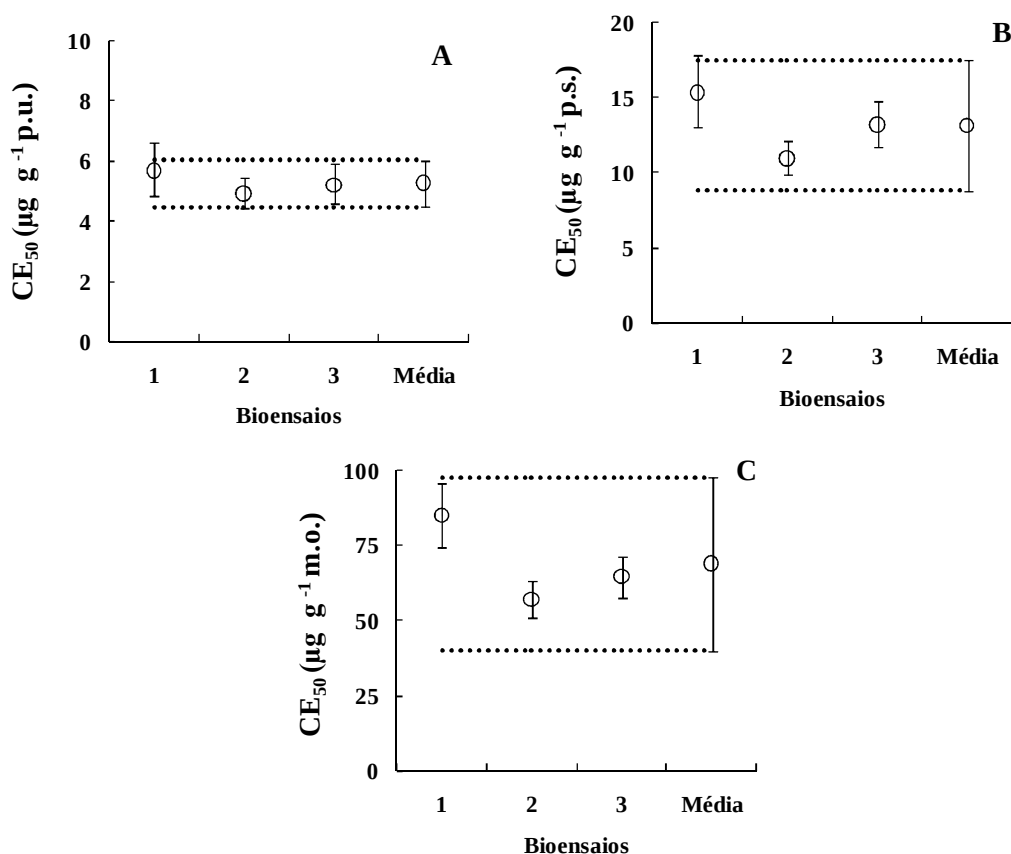


Figura 18 - Registro da CE₅₀-96h do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa úmida para as fêmeas de *Tisbe biminiensis*. Os resultados estão apresentados em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C). As barras de erro em torno da CL₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CL₅₀ média, as barras representam ± 2 desvios padrões.

5.4.3 Efeito letal do TBT adsorvido à fração lamosa liofilizada e estocada

Na lama liofilizada, não houve diferenças significativas quanto à mortalidade entre o controle e o controle do solvente (teste t pareado, $t = 2$, $gl = 2$, $p = 0,18$) (Fig. 19). No primeiro bioensaio, com 10 dias de estocagem, as CL₅₀-96h em termos de peso úmido, peso seco e matéria orgânica foram $20 \mu\text{g g}^{-1}$ p.u., $50 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. e $212 \mu\text{g g}^{-1}$ m.o., respectivamente. Estas CL₅₀-96h indicam que houve um aumento na toxicidade letal relativamente à fração lamosa não liofilizada. Ao longo de estocagem, no entanto, houve uma redução na toxicidade letal da fração lamosa liofilizada (Fig. 20). Após 20 e 30 dias de estocagem, as CL₅₀-96h foram 25 e $29 \mu\text{g g}^{-1}$ p.u., respectivamente. As CENO foram estimadas em 14, 18 e $25 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ p.u. nos bioensaios com 10, 20 e 30 dias após liofilização (teste de Dunnet, $Q < 2,15$, $p > 0,05$). As CEO foram respectivamente 18, 21 e $29 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ p.u. (teste de Dunnet, $Q > 2,15$, $p < 0,05$).

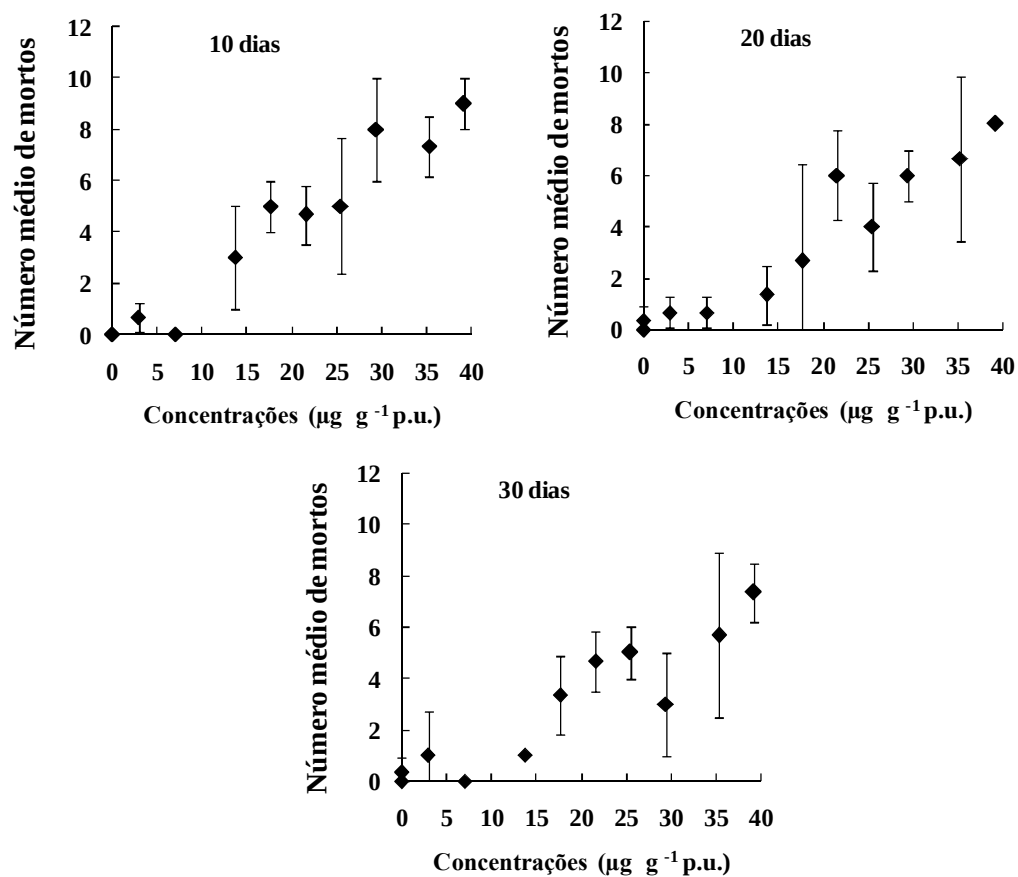


Figura 19 - Número médio de fêmeas de *Tisbe biminiensis* mortas em função das concentrações de tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa liofilizada ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) nos bioensaios com 10, 20 e 30 dias após liofilização. As barras de erro em cada concentração representam ± 1 desvio padrão.

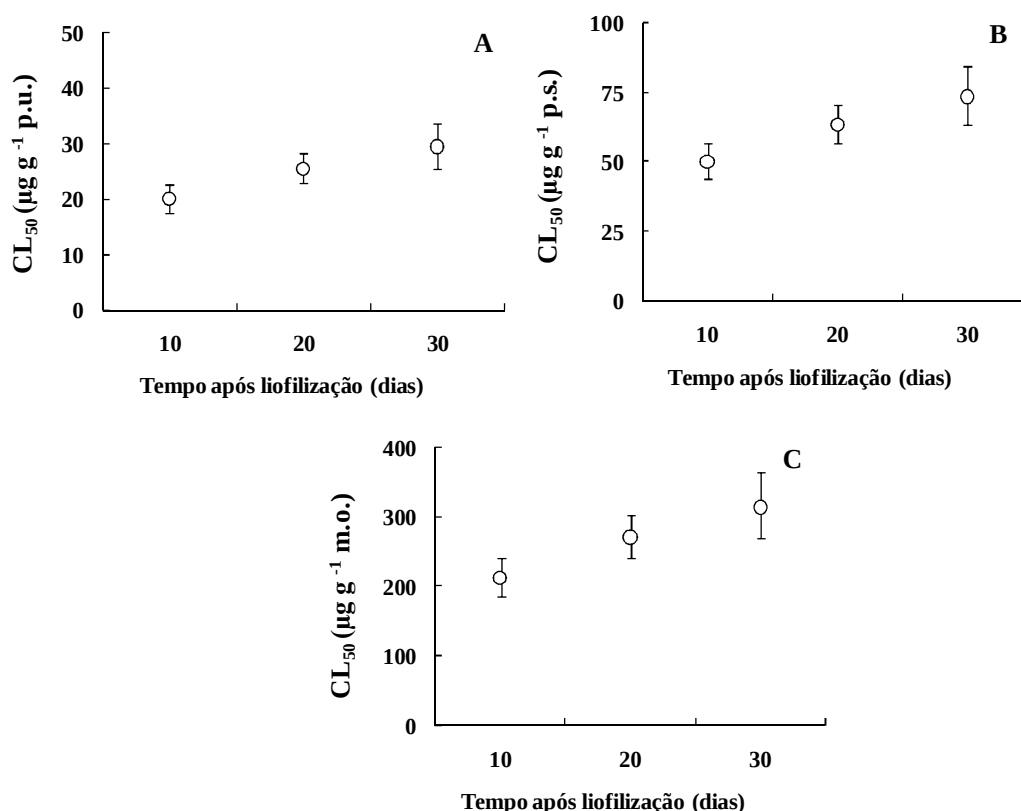


Figura 20 - Registro da CL₅₀-96h do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa liofilizada em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C) para as fêmeas de *Tisbe biminiensis*. As barras de erro em torno da CL₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%).

5.4.4 Efeito sub-letal do TBT adsorvido à fração lamosa liofilizada

Não houve diferenças significativas quanto à fecundidade total no controle e controle do solvente (teste t, $t = -0,57$, $gl = 2$, $p = 0,57$). O efeito do TBT adsorvido à fração lamosa liofilizada e estocada sobre a fecundidade total de *T. biminiensis* está apresentado na Figura 21. Nos bioensaios após 20 e 30 dias de liofilização, as CEO foram estimadas em $2,9 \mu\text{g g}^{-1}$ p.u. para ambos os testes. Na lama liofilizada, as CE₅₀-96h médias em termos de peso úmido, peso seco e matéria orgânica foram $6 \mu\text{g g}^{-1}$ p.u., $15 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. e $61 \mu\text{g g}^{-1}$ m.o., respectivamente (Fig. 22). Os coeficientes de variação dessas CE₅₀-96h foram respectivamente 20%, 18% e 19%. Não houve diferenças significativas entre as CE₅₀-96h médias (em base de matéria orgânica) obtidas nos bioensaios com lama úmida e lama liofilizada (teste t, $t = -1,02$, $gl = 3$, $p = 0,37$).

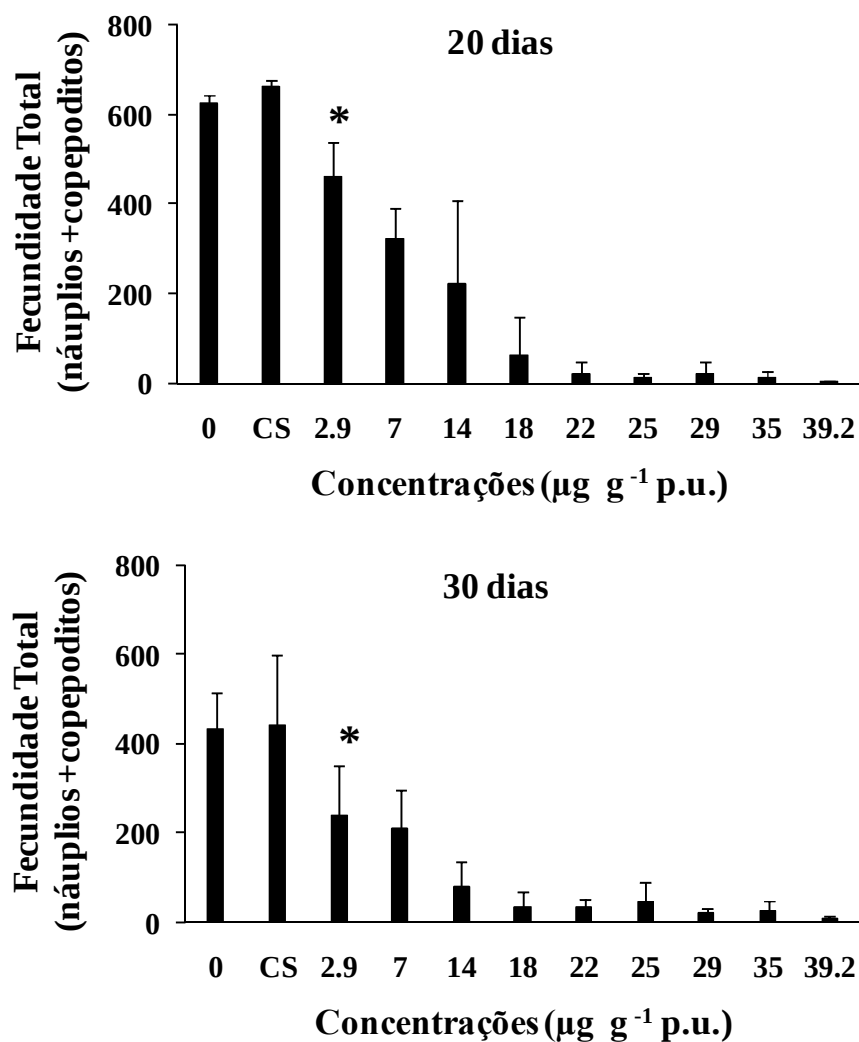


Figura 21 - Efeito do tributilestanho (TBT) após 20 e 30 dias de liofilização sobre a fecundidade total média (náuplios + copepoditos) das fêmeas de *Tisbe biminiensis* em dois bioensaios de 96 h. Os asteriscos indicam a concentração de efeito observado (CEO) em cada bioensaio. As concentrações 0 e CS representam a fecundidade total no controle e no controle do solvente, respectivamente. As barras de erro em cada concentração representam um desvio padrão.

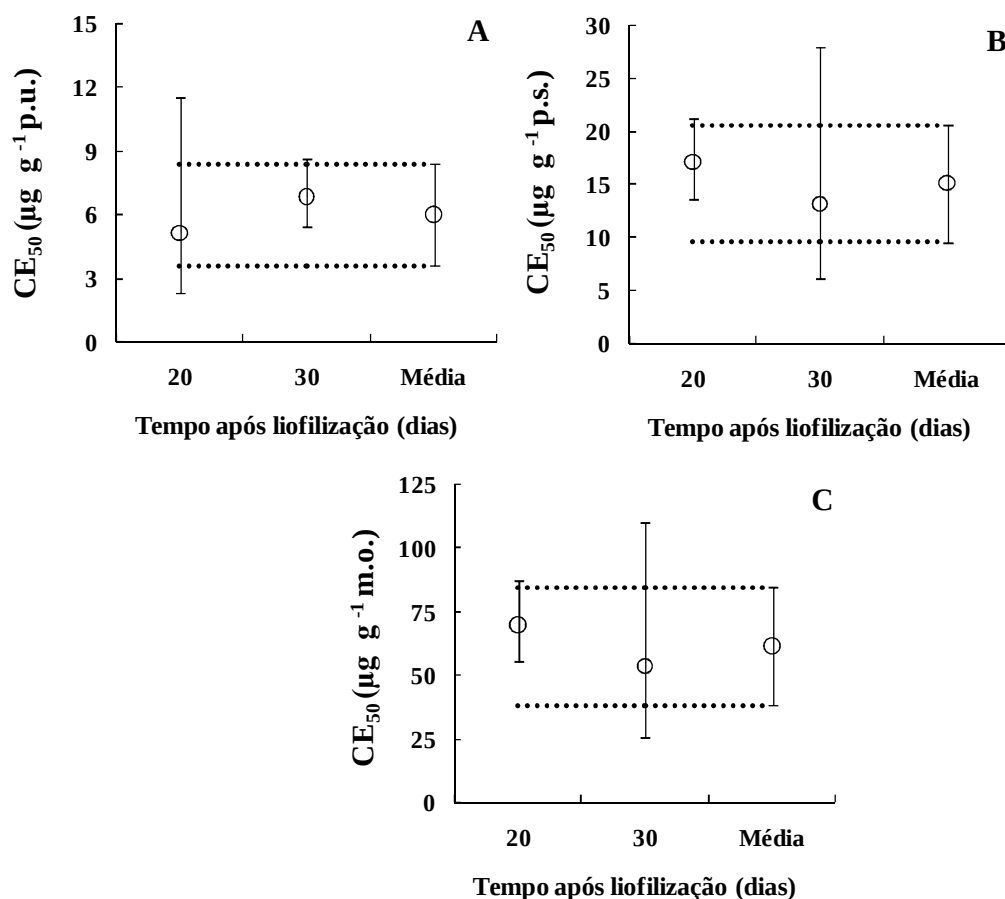


Figura 22 - Registro da CE₅₀-96h do tributilestanho (TBT) adsorvido à fração lamosa liofilizada em base de peso úmido (A), peso seco (B) e matéria orgânica (C) sobre a fecundidade total (náuplios + copepoditos) das fêmeas de *Tisbe biminiensis*. As barras de erro em torno da CE₅₀ de cada bioensaio representam o intervalo de confiança (95%). Para a CE₅₀ média, as barras de erro representam ± 2 desvios padrões.

5.5 DISCUSSÃO

Para avaliar a toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento é possível utilizar a predição feita a partir da teoria de equilíbrio de partição (em inglês, *Equilibrium Partitioning*, EqP) (DI TORO *et al.*, 1991; MEADOR, 2000). A EqP prediz que, no equilíbrio termodinâmico, a fugacidade de um composto nas fases que compõem um determinado sistema (e.g., sedimento, composto por partículas, água e organismos) é equivalente (BIERMAN, 1990). DI TORO *et al.* (1991) primeiramente avaliaram a toxicidade de compostos orgânicos não iônicos (CONI) segundo esta predição da EqP e estabeleceram duas predições: 1) a toxicidade de um CONI dissolvido na água intersticial (sistema água intersticial-sedimento em equilíbrio) equivale à toxicidade do

mesmo dissolvido na água (o CONI causará um efeito quantificável na mesma concentração) e 2) no equilíbrio não há uma via de exposição preponderante dos organismos. Estas predições foram estabelecidas para sedimentos cujo teor orgânico é maior que 0,2%, caracterizando assim o carbono orgânico como a principal fase para sorção dos CONI (DI TORO *et al.*, 1991).

No ambiente marinho, a molécula de TBT é descrita como um CONI e encontra-se principalmente como TBTOH, TBTCl e TBTHCO₃ (RADKE *et al.*, 2008). A primeira predição da EqP segundo proposto por DI TORO *et al.* (1991) foi avaliada no presente estudo. A fração lamosa utilizada teve teor orgânico médio de 8%, sugerindo que esta fração possuiu elevada capacidade de adsorver o TBT (LANGSTON e POPE, 1995). Para avaliar a primeira predição, as concentrações de TBT na água intersticial foram estimadas pela seguinte fórmula (DI TORO *et al.*, 1991; DRISCOLL *et al.*, 1998):

$$C_{AI} = \frac{C_s (\mu\text{g g}^{-1} \text{m.o.})}{K_{oc}} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde, C_{AI} é a concentração de TBT na água intersticial ($\mu\text{g L}^{-1}$), C_s é a concentração do TBT no sedimento ($\mu\text{g g}^{-1} \text{m.o.}$) e K_{oc} é o coeficiente de partição entre o carbono orgânico no sedimento e na água. Nestas estimativas foi utilizado o K_{oc} de 25,1 L g^{-1} publicado por MEADOR *et al.* (1997). As concentrações de TBT na água intersticial variaram de 1 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as CL_{50-96h} variaram de 9,7 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (média de 13 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$) (Tab. 7). A CL_{50-96h} média do TBT na água intersticial esteve dentro da mesma ordem de grandeza da CL_{50-48h} obtida nas exposições aquosas e isto demonstra a eficácia da primeira predição feita por DI TORO *et al.* (1991) para os CONI. Este resultado corrobora a conclusão reportada por MEADOR (2000) de que, no ambiente marinho, o TBT comporta-se de acordo com a predição acima reportada. Vale ressaltar que as predições feitas por DI TORO *et al.* (1991) foram estabelecidas para sedimentos cujo teor orgânico variou de 0,09 a 12%, entretanto tais predições podem não ser verdadeiras para sedimentos com teores orgânicos mais elevados.

Tabela 7 - Variação das concentrações de tributilestanho (TBT) na fração lamosa ($\mu\text{g g}^{-1}$ matéria orgânica) e na água intersticial (AI) ($\mu\text{g L}^{-1}$) e das $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para cada uma destas vias de exposição. As concentrações de TBT na água intersticial foram obtidas a partir das concentrações nominais de TBT adsorvido à fração lamosa segundo predição feita pela teoria de equilíbrio de partição ((DI TORO *et al.*, 1991).

Concentrações - Sedimento	$\text{CL}_{50-96\text{h}}$	Concentrações - AI	$\text{CL}_{50-96\text{h}}$
($\mu\text{g g}^{-1}$ m.o.)	($\mu\text{g g}^{-1}$ m.o.)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
17 - 631	245 - 430	1 – 25	9,7 - 15

Os resultados reportados por MEADOR *et al.* (1997) falsearam para o TBT a segunda predição feita por DI TORO *et al.* (1991). Para os anfípodos *Rhepoxynius abronius* e *Eohaustorius washingtonianus* e para o poliqueta *Armandia brevis*, a água intersticial foi a via preponderante de absorção do TBT (MEADOR *et al.*, 1997). A via de absorção preponderante para um determinado composto está relacionada aos coeficientes de partição do mesmo (K_{ow} , K_{oc} e K_{DOC}) e ao hábito do organismo. Para poluentes com $\log K_{oc}$ menor que 5 a água intersticial é a via preponderante de exposição (LANDRUM e ROBBINS, 1990). MEADOR *et al.* (1997) reportaram que o K_{oc} ($\log K_{oc} = 4,4$) foi cinco vezes maior que o K_{ow} e o K_{DOC} foi três vezes menor que o K_{ow} . Estes autores indicaram que o teor orgânico do sedimento determinou as concentrações de TBT livre (não adsorvido ao carbono orgânico dissolvido) na água intersticial, influenciando a bioacumulação e toxicidade do TBT. O elevado K_{oc} do TBT pode influenciar sua taxa de absorção (k_1) a partir das exposições via água e sedimento. Para o anfípodo *Eohaustorius washingtonianus* o k_1 médio foi $2429 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nas exposições aquosas, porém nas exposições com sedimento esta taxa foi reduzida a $854 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (MEADOR *et al.*, 1993; MEADOR *et al.*, 1997).

O efeito do hábito das espécies sobre a bioacumulação de TBT a partir do sedimento foi avaliado para diferentes espécies (LANGSTON e BURT, 1991; MEADOR, 1997; COELHO *et al.*, 2002a). Os anfípodos *Eohaustorius washingtonianus* (detritívoro) e *Rhepoxynius abronius* (predador da meiofauna) absorveram o TBT preferencialmente via água intersticial. O poliqueta *Armandia brevis* (depositívoro) também absorveu o TBT via água intersticial, entretanto o molusco depositívoro *Scrobicularia plana* absorveu o TBT preferencialmente via sedimento (LANGSTON e BURT, 1991; MEADOR *et al.*, 1997). O molusco bentônico e suspensívoro *Ruditapes decussatus* absorveu o TBT preferencialmente via água (COELHO *et al.*, 2002a). Segundo o sistema de classificação de hábito proposto por DI TORO *et al.* (1991), *T. biminiensis* é um comedor de depósito epibentônico. Exposto a substrato, *T. biminiensis* alimenta-se de detritos orgânicos e de microrganismos (ARAUJO-CASTRO *et al.*, 2009). Dessa forma, *T. biminiensis* pode absorver o TBT a partir da água intersticial e dos detritos ingeridos. *T. biminiensis* assemelha-se ao anfípodo *E. washingtonianus* no hábito

detritívoro, e isto sugere que a água intersticial pode ter sido a via preponderante de absorção do TBT por *T. biminiensis* exposto à fração lamosa com baixo teor orgânico.

A toxicidade letal do TBT adsorvido ao sedimento foi avaliada para poucas espécies bentônicas, entre as quais o copépodo *T. biminiensis*, os anfípodos *R. abronius*, *Eohaustorius washingtonianus*, *Tiburonella viscana* e o poliqueta *Armandia brevis* (Tab. 8). A concentração letal do TBT adsorvido ao sedimento para *T. biminiensis* foi menor relativamente às concentrações reportadas para as espécies *R. abronius*, *E. washingtonianus* e *A. brevis* considerando os diferentes tempos de exposição (Tab. 8). Apenas para *T. biminiensis* foi quantificado o efeito do TBT sobre a fecundidade total dos organismos, que foi reduzida em 50% em concentrações médias de $13 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.. Esta concentração sub-letal é seis vezes menor que a concentração letal ($74 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.), demonstrando a extrema sensibilidade deste parâmetro. Os bioensaios com as espécies *T. biminiensis* e *T. viscana* foram conduzidos com espécimes coletados na costa brasileira. Para esta região, existem apenas 7 trabalhos reportando concentrações de TBT no sedimento (Figura 23). No sedimento, a menor concentração reportada foi $0,014 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. na Baía de Todos os Santos e a maior concentração foi $7 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. no Complexo estuarino de Paranaguá (FELIZZOLA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). Esta faixa de concentrações de TBT está próxima às concentrações de efeito sobre as espécies *T. biminiensis* e *T. viscana*. Nestas concentrações é provável que: 1) a comunidade meiofaunal sofra mudanças na riqueza e diversidade das espécies (e.g., AUSTEN *et al.* (1997) reportaram este efeito em concentrações de $1,5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ p.s.); 2) populações de anfípodos e copépodos tenham suas taxas de crescimento reduzidas devido à mortalidade e redução na fecundidade induzidas pelo TBT e 3) populações de microalgas bentônicas tenham suas taxas de crescimento populacional reduzidas (CHEUNG *et al.*, 2003).

A Resolução 454 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, 2012) estabelece dois níveis para as concentrações poluentes no sedimento. Estes níveis relacionam as concentrações dos poluentes no sedimento à probabilidade de ocorrência de efeitos deletérios. Para o TBT, o nível abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota é $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. (Nível I) e o nível acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota é $1 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. (Nível II) (Figura 23). Os níveis estabelecidos para o TBT são próximos às concentrações de efeito reportadas para as espécies *T. biminiensis* e *T. viscana* e podem não ser considerados adequados para proteção de populações bentônicas. Dessa forma, estes níveis devem ser revisados aplicando-se um fator de segurança maior a partir das concentrações de efeito reportadas para espécies da costa brasileira.

Tabela 8 - CL₅₀ e resíduo tecidual crítico (*critical-body-residue*, CBR) de contaminantes orgânicos para diferentes espécies de animais.

Grupo	Espécie	Poluente	CL ₅₀ (µg g ⁻¹ p.s.)	CL ₅₀ (µg g ⁻¹ m.o.)	CBRs (µmol g ⁻¹)	Tempo (dias)	Referência
Copépodos	<i>Tisbe biminiensis</i>	TBT	74	358		4	Este estudo
	<i>Schizopera Knabeni</i>	Diesel	194			4	1
		Fenantreno	473			4	1
		Fenantreno	345			10	2
		Fluoranteno	2.100			4	1
		Fluoranteno	213		2,7 (p.u.)	10	3
	<i>Coulana</i> sp.	Fluoranteno	132		1,2 (p.u.)	10	3
	<i>Nitocra lacustris</i>	Fenantreno	105			10	2
Anfípodo	<i>Rhepoxynius abronius</i>	TBT		3500	0,203 (p.s.)	10	4 e 5
	<i>Eohaustorius washingtonianus</i>	TBT		170	0,148 (p.s.)	10	4 e 5
	<i>Leptocheirus pkumufos</i>	Fluoranteno (via água)			0,69-2,4 (p.u.)	8	6
	<i>Leptocheirus pkumufos</i>	Fluoranteno (via sedimento)			0,301 (p.u.)	8	6
	<i>Tiburonella viscana</i>	TBT	1,69	211		10	7
Poliqueta	<i>Arandia brevis</i>	TBT		930	0,141 (p.s.)	10	4 e 5
Peixe	<i>Platichthys stellatus</i>	TBT			0,169 (p.s.)	10	5

Nota 1 – **p.s.**: peso seco; **p.u.**: peso úmido; **m.o.**: matéria orgânica; **TBT**: tributilestanho. **Referências:** (1) LOTUFO (1997); (2) LOTUFO e FLEEGER (1997); (3) LOTUFO (1998); (4) MEADOR *et al.* (1997); (5) MEADOR (1997); (6) DRISCOLL *et al.* (1998); (7) PERINA *et al.* (2009).

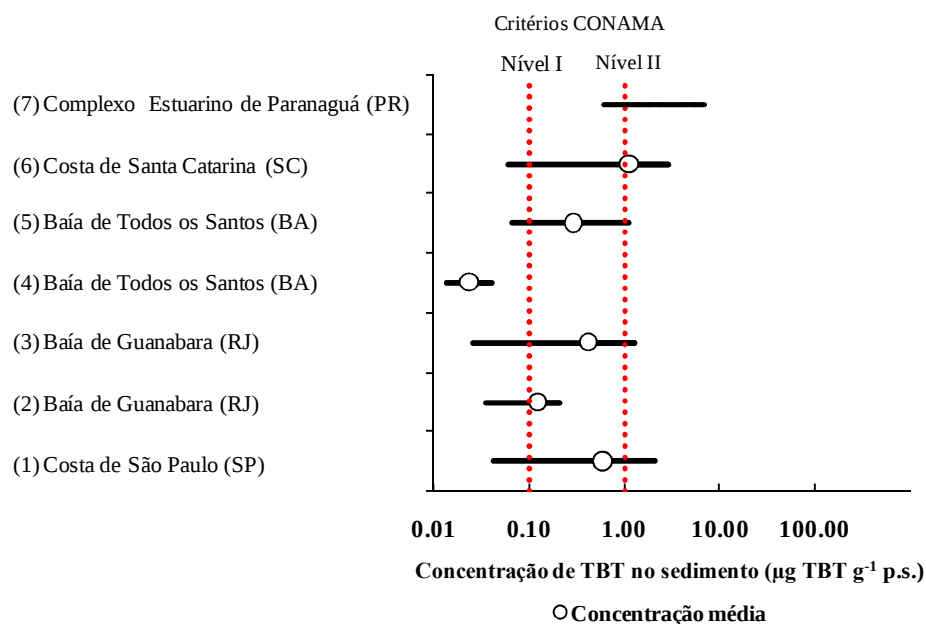


Figura 23 – Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) mínimas e máximas de TBT no sedimento em termos de peso seco em diferentes de regiões costeiras do Brasil. O círculo representa as concentrações médias. As linhas verticais em vermelho representam os níveis estabelecidos na Resolução CONAMA 454 em termos de peso seco. **Referências:** (1) GODOI *et al.* (2003); (2) ALMEIDA *et al.* (2004); (3) FERNANDEZ *et al.* (2005); (4) FELIZZOLA *et al.* (2008); (5) PLETSCH *et al.* (2010); (6) OLIVEIRA *et al.* (2010); (7) SANTOS *et al.* (2009).

Os efeitos do TBT sobre a fecundidade total de *T. biminiensis* podem estar relacionados à sensibilidade específica dos estágios larvais (náuplios) e à interferência endócrina do TBT no sistema reprodutivo das fêmeas (LOTUFO e FLEEGER, 1997). O TBT é um potente interferente endócrino em copépodos, comprometendo o crescimento dos estágios larvais e aspectos reprodutivos como a maturação, determinação sexual, produção e eclosão dos ovos (Tab. 9) (ANDERSEN *et al.*, 2001). A partir dos resultados reportados na Tabela 9, uma escala de efeitos do TBT sobre copépodos é proposta no presente trabalho (Figura 24). Estes efeitos ocorrem em concentrações variando de 0,7 a 500 ng L^{-1} e, juntamente com a mortalidade nos diferentes estágios de vida, podem reduzir a taxa de crescimento populacional dos copépodos (HUANG *et al.*, 2010). A inibição do crescimento dos organismos provavelmente está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio e à diminuição nos níveis de testosterona nos estágios larvais (ANDERSEN *et al.*, 2001; HOLLINGWORTH *et al.*, 2001). Os efeitos sobre os aspectos reprodutivos (e.g., fecundidade) podem decorrer da interferência do TBT em processos mediados por hormônios, como a maturação dos ovos (LEBLANC e MCLACHLAN, 1999). Outra hipótese sugerida para explicar a redução na fecundidade dos organismos está relacionada a alterações morfológicas induzidas pelo TBT no sistema reprodutor das fêmeas (HUANG *et al.*, 2010). Dessa forma, a redução na fecundidade total de *T. biminiensis* pode ser consequência de reduzida produção e

eclosão de ovos, reduzida sobrevivência larval e danos ao sistema reprodutor das fêmeas. A elevada sensibilidade da fecundidade total de *T. biminiensis* fez com que as CE_{50-96h} ($CV = 18\%$) fossem menos variáveis que as CL_{50-96h} ($CV = 32\%$).

A análise do resíduo tecidual crítico (em inglês, *critical-body-residue*, CBR) pode complementar a avaliação da toxicidade do TBT adsorvido ao sedimento feita no presente estudo. O CBR relaciona os efeitos tóxicos (e.g, mortalidade e efeitos sobre a reprodução) dos poluentes a concentrações residuais nos tecidos dos organismos (MCELROY *et al.*, 2011). A abordagem do CBR integra compostos com modos de ação semelhantes, reduzindo a variabilidade nas estimativas de toxicidade (e.g, LR_{50}) entre diferentes espécies (MCELROY *et al.*, 2011). Pelo modo de ação, os compostos orgânicos são descritos como narcóticos (e.g., fluoranteno) (DRISCOLL *et al.*, 1998; LOTUFO, 1998b), cujas concentrações de CBR variam entre 2 a $8 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.u., e não narcóticos (e.g., TBT), com CBR 100 vezes menores (MEADOR, 1997). A narcose resulta da desregulação da homeostase celular e modifica a permeabilidade das membranas, prejudicando funções vitais (e.g., alimentação) e podendo levar à morte do organismo (LOTUFO, 1997). O efeito não narcótico associado ao TBT consiste na interferência da síntese de ATP na mitocôndria (MCELROY *et al.*, 2011).

MEADOR *et al.* (2006) reportaram que o CBR médio associado ao efeito letal pelo TBT é $0,167 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.s. ($48 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s., $CV = 37\%$). O CBR médio associado a prejuízos no crescimento de peixes, ostras, mexilhões e poliquetas é $0,01 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.s. ($3,2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s., $CV = 57\%$) (MEADOR, 2006; MEADOR *et al.*, 2008). Para os anfípodos *E. washingtonianus* e *R. abronius*, MEADOR *et al.* (1997) reportaram CBR letais de $0,15 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.s. ($43 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) e $0,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.s. ($54 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.), respectivamente. Considerando-se o anfípodo *E. washingtonianus* como modelo mais próximo ao copépodo *T. biminiensis*, os CBR para efeitos letais e sub-letais do TBT em *T. biminiensis* podem ser similares aos reportados para este anfípodo (Tab. 8). A comparação dos CBR letais reportados para o TBT e para outros contaminantes orgânicos indica que o TBT é mais tóxico para os organismos que alguns hidrocarbonetos (Tab. 8). LOTUFO (1998b) reportou que o CBR associado à redução na fecundidade dos copépodos pelo fluoranteno foi cerca de 80% menor que o CBR associado ao efeito letal. Pelo fato do TBT ser mais potente que os HPA, a redução no CBR para efeitos sub-letais pode ser maior. Esta análise é corroborada pelos resultados reportados por MACKEN *et al.* (2008) em bioensaios com o copépodo *Tisbe battagliai*. MACKEN *et al.* (2008) reportaram que o TBT ($CL_{50-48h} = 17 \mu\text{g L}^{-1}$) foi mais tóxico que o PCB-153 ($116 \mu\text{g L}^{-1}$), fluoranteno ($241 \mu\text{g L}^{-1}$) e benzo(a)pireno ($1010 \mu\text{g L}^{-1}$). A comparação da CE_{50-96h} do TBT sobre a fecundidade de *T. biminiensis* ($6,5 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) com as CE_{50-14d} reportadas para óleo diesel ($64 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.), fenantreno ($52 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) e fluoranteno ($38 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) em bioensaios com *Schizopera knabeni* confirma a análise feita acima (LOTUFO, 1997). É possível, entretanto, que as diferenças na sensibilidade acima reportadas estejam relacionadas a diferenças no hábito de

alimentação das espécies, definindo a via de exposição e absorção preponderante para cada espécie (MEADOR *et al.*, 1997; COELHO *et al.*, 2002a).

Após 10 dias de liofilização da fração lamosa, a CL_{50-96h} foi menor relativamente à CL_{50} média obtida na fração úmida ($20 \mu g g^{-1}$ p.u. e $31 \mu g g^{-1}$ p.u. nas frações liofilizada e úmida, respectivamente). Esta toxicidade acentuada assemelha-se aos resultados obtidos por GEFARD *et al.* (2002; 2004) e BEIRAS e HIS (1995) através de bioensaios com embriões da ostra *C. gigas*. Estes autores reportaram que a liofilização tornou mais tóxicos sedimentos contaminados com metais pesados e HPA e os respectivos elutriatos. Segundo os autores, esta toxicidade acentuada resultou da conjugação de vários fatores: aumento nas concentrações de amônia, de carbono orgânico dissolvido e particulado e de HPA no elutriato. GEFARD *et al.* (2002) sugeriram também que após a liofilização poderia haver a desorção de outros compostos orgânicos, aumentando a toxicidade do elutriato.

Nos bioensaios com *T. biminiensis* é provável que a toxicidade após 10 dias da liofilização esteja relacionada ao aumento nas concentrações de carbono orgânico particulado e elevadas concentrações de amônia no elutriato (GEFARD *et al.*, 2002). GEFARD *et al.* (2002) reportaram que em amostras de sedimento com teor médio de silte de 71%, houve um aumento médio de 62% na concentração de carbono orgânico particulado no elutriato após a liofilização. Segundo GEFARD *et al.* (2002), a liofilização torna as partículas mais fáceis de serem desagregadas, e portanto, menos densas. Nestas mesmas amostras, a concentração média de amônia aumentou 347% após a liofilização (GEFARD *et al.*, 2002). As elevadas concentrações de amônia estão relacionadas à eliminação da microflora que regula o ciclo do nitrogênio no sedimento (GEFARD *et al.*, 2002). Nos bioensaios com *T. biminiensis*, o aumento nas concentrações de carbono orgânico particulado pode ter facilitado a desorção do TBT para o estado dissolvido, tornando-o biodisponível para *T. biminiensis*. Elevadas concentrações de amônia no elutriato podem ter tido um efeito sinérgico com o TBT, aumentando a toxicidade do elutriato.

Tabela 9 - Estimativas das concentrações de tributilestanho (TBT) que causam efeitos crônicos em diferentes espécies de copépodos. **CL₅₀**: concentração letal a 50% dos organismos expostos; **CEO**: concentração de efeito observável; **CE₅₀**: concentração que reduziu em 10% ou 50% o parâmetro sob consideração após o período de exposição.

Efeitos	Parâmetro	Concentração (ng L ⁻¹)	Espécie	Referência
Letal (adultos)	CL ₅₀	980*		KEGLEY <i>et al.</i> (2011)
Sub-letal				
Inibição do desenvolvimento	CE ₁₀ -8d	0,7	<i>Acartia tonsa</i>	KUSK e PETERSEN (1997)
	CE ₅₀ -8d	3	<i>Acartia tonsa</i>	KUSK e PETERSEN (1997)
	CEO-6d	6-20	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	HUANG <i>et al.</i> (2006)
Produção de ovos	CEO-72h	10	<i>Acartia tonsa</i>	JOHANSEN e MOBLEMBERG (1987)
Sobrevivência larval	CE ₅₀ -8d	15-20	<i>Acartia tonsa</i>	KUSK e PETERSEN (1997)
	CEO-13	100-200	<i>Euryremora affinis</i>	HALL <i>et al.</i> (1988)
Idade da Primeira ninhada	CEO-19d	6-20	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	HUANG <i>et al.</i> (2006)
Percentual de fêmeas ovígeras	CEO-19d	60	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	HUANG <i>et al.</i> (2006)
Proporção sexual	CEO-19d	20	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	HUANG <i>et al.</i> (2006)
Eclosão dos ovos	CEO-72h	60	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	HUANG <i>et al.</i> (2006)
Fecundidade	CE ₅₀ -14d	55	<i>Tigriopus japonicus</i>	ARA <i>et al.</i> (2010)
	CEO-3d	500	<i>Euryremora affinis</i>	HALL <i>et al.</i> (1988)

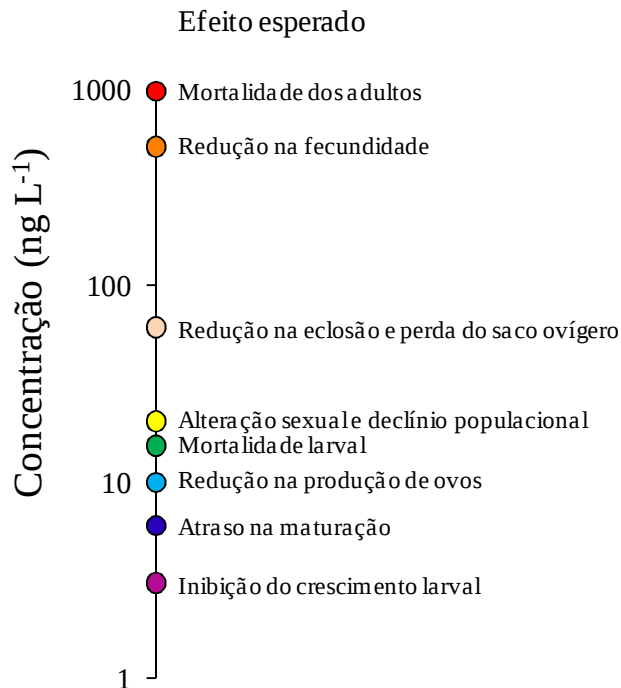


Figura 24 – Escala de efeitos do TBT sobre os copépodos. Os efeitos e as concentrações crônicas foram obtidas a partir dos resultados reportados na Tabela 9. A concentração letal é a CL₅₀ mediana do TBT para copépodos adultos, obtida a partir dos resultados reportados por KEGLEY *et al.* (2011) e pelo presente trabalho.

A estocagem ao longo de 30 dias das amostras liofilizadas reduziu a toxicidade letal das mesmas em 40%. Apesar disso, a CL₅₀ média para a fração liofilizada (25 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u.) foi menos variável (CV = 19%) relativamente à fração úmida (CV = 27%). Esta menor variabilidade da CL₅₀-96h foi uma vantagem associada à liofilização, entretanto pode ter sido resultante da eliminação dos micro-gradientes físico-químicos presentes no sedimento úmido. A eliminação dos micro-gradientes é uma desvantagem associada à liofilização, pois prejudica a caracterização da toxicidade real de amostras coletadas no campo (AHRENS e DEPRE, 2004). A atenuação da toxicidade com o tempo de estocagem sugere que a liofilização não deve ser utilizada como método de preparo e estocagem de amostras coletadas no campo. Este efeito deve ser avaliado futuramente para amostras contaminadas com outras classes de contaminantes (e.g., metais).

O efeito da estocagem de amostras úmidas sobre a toxicidade já foi avaliado (DILLON *et al.*, 1994; CARR e CHAPMAN, 1995; MOORE *et al.*, 1995; DEFOE e ANKLEY, 1998) e as respostas variam em função da temperatura, do tipo de sedimento e contaminante testados. O efeito da estocagem de sedimentos liofilizados sobre a toxicidade, entretanto, foi avaliado apenas por GEFFARD *et al.* (2004). GEFFARD *et*

al. (2004) reportaram o efeito da estocagem de sedimentos liofilizados (contaminados com metais e HPA) sobre a toxicidade ao longo de 120 dias. Apenas nos sedimentos contaminados com metais houve aumento significativo na toxicidade com o tempo de estocagem, entretanto, os autores associaram este efeito à variabilidade biológica dos organismos teste. A atenuação da toxicidade nos bioensaios com *T. biminiensis* contrasta com os resultados reportados por GEFARD *et al.* (2004) e pode estar associada a variações nas concentrações de carbono orgânico dissolvido no elutriato. Variações nas concentrações de carbono orgânico dissolvido influenciam os fatores de bioconcentração do TBT pelos organismos (FENT e LOOSER, 1995). FENT e LOOSER (1995) reportaram uma redução na biodisponibilidade de TBT em concentrações de ácidos húmicos dissolvidos variando de 0 a 10 mg L⁻¹. Para *Daphnia magna*, o fator de bioconcentração para o TBT reduziu de 170 para 100, enquanto para a espécie *Thymallus thymallus* houve uma redução de 2000 para 1000. Dessa forma, o aumento nas concentrações de carbono orgânico dissolvido produziria uma menor biodisponibilidade de TBT para *T. biminiensis* e, portanto, maiores valores de CL₅₀ ao longo do tempo.

A liofilização da fração contaminada com TBT pode ainda ter influenciado a especiação e sorção desta molécula às partículas. A especiação do TBT é controlada pelo pH. Em pH 8 predominam espécies neutras, como TBTCl, TBTOH e TBTHCO₃ (FENT e LOOSER, 1995; RADKE *et al.*, 2008). Segundo FENT e LOOSER (1995), as espécies neutras são absorvidas pelos organismos mais facilmente do que o cátion TBT⁺. Entretanto, em pH 7 a 9, as espécies neutras adsorvem-se menos efetivamente às partículas do que o cátion TBT⁺ (RADKE *et al.*, 2008). Dessa forma, variações na especiação do TBT após liofilização também poderiam alterar os fatores de adsorção à fração lamosa e a bioacumulação do TBT nos bioensaios com *T. biminiensis*.

O aumento na CL₅₀-96h com o tempo não deve estar relacionado a reduções nas concentrações de TBT, visto que a liofilização mantém a estabilidade destas moléculas (QUEVAUVILLER e DONARD, 1991). O efeito da liofilização como método de preparo e estocagem do sedimento deve ser avaliado também para amostras fortificadas com metais e outros compostos orgânicos (e.g., PCB). Estes estudos são necessários para assegurar a viabilidade da liofilização como método de preparo das amostras para os bioensaios.

T. biminiensis foi agudamente sensível ao TBT adsorvido à fração lamosa, com CL₅₀-96h média de 31 µg g⁻¹ p.u., 74 µg g⁻¹ p.s. e 358 µg g⁻¹ m.o. em termos de peso úmido, peso seco e matéria orgânica, respectivamente. A fecundidade total de *T. biminiensis* foi reduzida em 50% em concentrações seis vezes menor que a letal, sendo o parâmetro mais sensível e menos variável nos bioensaios. A toxicidade letal do TBT adsorvido à fração lamosa corroborou a predição feita por DI TORO *et al.* (1991) a partir da teoria de equilíbrio de partição, com uma CL₅₀-96h na água intersticial próxima à CL₅₀-48h obtida nas exposições aquosas. A liofilização reduziu a CL₅₀-96h, entretanto, houve um aumento deste parâmetro com o tempo de estocagem.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O agrupamento das CL_{50} por critérios taxonômicos, experimentais e químicos mostrou-se útil para avaliar a toxicidade aguda do TBT para os crustáceos. Os agrupamentos permitiram estimar e comparar as CL_{50} medianas e avaliar os fatores relacionados à variabilidade deste parâmetro. A revisão bibliográfica evidenciou que as espécies de copépodos marinhos e estuarinos são as mais sensíveis ao TBT, inclusive em relação ao cladóceros *D. magna* (modelo de água doce). Estima-se que os copépodos adultos marinhos/estuarinos e cladóceros completarão seu ciclo de vida em concentrações de TBT inferiores a 0,03 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

T. biminiensis foi relativamente menos sensível ao TBT do que outras espécies de copépodos bentônicos, com $CL_{50-48\text{h}}$ média de 36 $\mu\text{g L}^{-1}$. A sensibilidade de *T. biminiensis* variou significativamente entre os bioensaios, possivelmente devido a variações fisiológicas dos organismos. Copépodos bentônicos são menos sensíveis ao TBT que os copépodos planctônicos. *T. biminiensis* absorveu o TBT mais rapidamente do que o cromo e a amônia.

T. biminiensis foi sensível ao TBT adsorvido à fração lamosa ($< 64 \mu\text{m}$) com $CL_{50-96\text{h}}$ e $CE_{50-96\text{h}}$ médias de 31 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u. e 5,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u., respectivamente. A fecundidade total de *T. biminiensis* foi o parâmetro mais sensível e menos variável nos bioensaios. As concentrações de TBT reportadas em regiões costeiras do Brasil são próximas às concentrações de efeito do TBT sobre *T. biminiensis* e podem comprometer o crescimento populacional de copépodos bentônicos. Um fator de segurança maior deve ser aplicado para estabelecer os níveis para as concentrações de TBT na Resolução CONAMA 454, de 2012. A liofilização da fração lamosa aumentou a toxicidade do TBT adsorvido a esta fração, reduzindo a $CL_{50-96\text{h}}$ para 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.u.. A estocagem da fração liofilizada em freezer a -20°C ao longo de 30 dias aumentou a $CL_{50-96\text{h}}$ do TBT adsorvido à fração lamosa. Apesar disso, a $CL_{50-96\text{h}}$ média da fração liofilizada foi menos variável relativamente à fração úmida, sendo isso um aspecto positivo da liofilização das amostras. Entretanto, o aspecto negativo da liofilização resulta da eliminação dos micro-gradientes físico-químicos do sedimento, podendo afetar a caracterização da toxicidade *in situ* de amostras coletadas no campo. Dessa forma, novos estudos com outros contaminantes (orgânicos e inorgânicos) devem ser realizados para uma melhor avaliação dos efeitos da liofilização no sedimento antes de aplicá-la como método para preparo de amostras para os bioensaios.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados do presente trabalho servirão de base para futuros bioensaios com *T. biminiensis*. Para esses estudos, sugere-se que sejam avaliados:

1. Efeitos crônicos do TBT sobre a sobrevivência e desenvolvimento de estágios larvais, sobrevivência de estágios juvenis, bem como a maturação e fecundidade das fêmeas de *T. biminiensis*;
2. Efeitos crônicos do TBT sobre as taxas de crescimento populacional (*r*) desta espécie;
3. As proporções entre toxicidade aguda e crônica nas exposições aquosas (e.g., CL₅₀/CE₅₀ na fecundidade) para o TBT e comparação com a proporção obtida a partir da exposição com sedimento e com registros da literatura para outras espécies.
4. Efeitos de outros contaminantes orgânicos e inorgânicos sobre diferentes estágios de vida de *T. biminiensis*.
5. Os fatores (e.g., estado nutricional) que influenciam a sensibilidade de *T. biminiensis* a diferentes contaminantes.

8. REFERÊNCIAS

ABALOS, M.; BAYONA, J.-M.; COMPANO, R.; GRANADOS, M.; LEAL, C.; PRAT, M.-D. Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review. **Journal of Chromatography A**, v. 788, n. 1-2, p. 1-49, 1997.

ACS. **SciFinder**. <https://scifinder.cas.org>. American Chemical Society. Data de Acesso: 22/06/2012 2012.

AHRENS, M. J.; DEPREE, C. V. Inhomogeneous distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in different size and density fractions of contaminated sediment from Auckland Harbour, New Zealand: an opportunity for mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 3-4, p. 341-350, 2004.

ALMEIDA, A. C.; WAGENER, A. L. R.; MAIA, C. B.; MIEKELEY, N. Speciation of organotin compounds in sediment cores from Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil)

by gas chromatography–pulsed flame photometric detection. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 694-704, 2004.

ALZIEU, C. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. **Marine Environmental Research**, v. 32, n. 1 - 4, p. 7-17, 1991.

ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1-2, p. 99-102, 2000a.

ALZIEU, C. Impact of tributyltin on marine invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 9, p. 71-76, 2000b.

ALZIEU, C.; HERAL, M.; THIBAUD, Y.; DARDIGNAC, M. J.; FEUILLET, M. Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huitre *Crassostrea gigas*. **Rev Trav Int Peches Marit**, v. 45, n. 2, p. 101-116, 1982.

ALZIEU, C.; MICHEL, P.; TOLOSA, I.; BACCI, E.; MEE, L. D.; READMAN, J. W. Organotin compounds in the Mediterranean: A continuing cause for concern. **Marine Environmental Research**, v. 32, n. 1-4, p. 261-270, 1991.

ALZIEU, C.; SANJUAN, J.; MICHEL, P.; BOREL, M.; DRENO, J. P. Monitoring and assesment of butyltins in Atlantic coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 20, n. 1, p. 22-26, 1989.

ALZIEU, C.; THIBAUD, Y.; HERAL, M.; BOUTIER, B. Evaluation des risques des á l'emploi des peintures antisalissures dans les zones conchylicoles. **Rev Trav Int Peches Marit**, v. 44, p. 301-348, 1980.

ALZIEU, C. L.; SANJUAN, J.; DELTREIL, J. P.; BOREL, M. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, n. 11, p. 494-498, 1986.

ANDERSEN, H. R.; WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K. O. Development of copepod nauplii to copepodites - a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2821-2829, 2001.

ANKLEY, G. T.; BENOIT, D. A.; BALOGH, J. C.; REYNOLDSON, T. B.; DAY, K. E.; HOKE, R. A. Evaluation of potential confounding factors in sediment toxicity tests with 3 fresh-water benthic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 627-635, 1994.

ANTIZAR-LADISLAO, B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**, v. 34, n. 2, p. 292-308, 2008.

AONO, A.; TAKEUCHI, I. Effects of tributyltin at concentrations below ambient levels in seawater on *Caprella danilevskii* (Crustacea : Amphipoda : Caprellidae). **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 515-523, 2008.

ARA, K.; FUJITA, Y.; HIROMI, J.; UCHIDA, N. Acute and subchronic toxicity of tributyltin chloride (TBTCl) to the marine Harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* Mori. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 8, n. 4, p. 293-303, 2010.

ARAMBARRI, I.; GARCIA, R.; MILLÁN, E. Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. **Chemosphere**, v. 51, n. 8, p. 643-649, 2003.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P. Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminensis*? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 327, n. 1, p. 58-69, 2005.

ARAUJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; TORREIRO, A. G. A. G.; GARCIA, K. S. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminensis* (Copepoda, Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 57, n. 1, p. 33-41, 2009.

ARAUJO, R. J. V. **Tolerância do Copepoda *Tisbe biminensis* à amônia em testes agudos**. 2005. 23 p. (Monografia de Especialização). Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARNOLD, C. G.; CIANI, A.; MULLER, S. R.; AMIRBAHMAN, A.; SCHWARZENBACH, R. P. Association of triorganotin compounds with dissolved humic acids. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 19, p. 2976-2983, 1998.

ASTM. **Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates**. American Society for Testing and Materials, n. E 1391-03. Philadelphia. 2003.

AUSTEN, M. C.; MCEVOY, A. J. Experimental effects of tributyltin (TBT) contaminated sediment on a range of meiobenthic communities. **Environmental Pollution**, v. 96, n. 3, p. 435-444, 1997.

BANGKEDPHOL, S.; KEENAN, H. E.; DAVIDSON, C.; SAKULTANTIMETHA, A.; SONGSASEN, A. The partition behavior of tributyltin and prediction of environmental fate, persistence and toxicity in aquatic environments. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1326-1332, 2009.

BAO, V. W. W.; LEUNG, K. M. Y.; QIU, J.-W.; LAM, M. H. W. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 5, p. 1147-1151, 2011.

BEATRICI, A. C.; AREZON, A.; COIMBRA, N. J.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* submetidas a diferentes cultivos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2006.

BECHMANN, R. K. Use of life tables and LC50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod *Tisbe furcata* (Baird). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1509-1517, 1994.

BECHMANN, R. K. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. **Science of the Total Environment**, v. 233, n. 1 - 3, p. 33-46, 1999.

BEIRAS, R.; HIS, E. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 47-49, 1995.

BENSON, R. **Tributyltin oxide**. World Health Organization Geneva, n. 14. 1999.

BIANCHINI, A.; MARTINS, S. E.; PEDROSO, M. S.; SAID, J. S.; SPENGLER, A. Biotic ligand model in fresh and sea water in Brazil. In: LAGOS, G. E.; WARNER, A. E. M., *et al* (Ed.). **Health, environment and sustainable development**. Santiago, v.2, 2003. p.543-552.

BIERMAN, V. J. Equilibrium partitioning and biomagnification of organic chemicals in benthic animals. **Environmental Science & Technology**, v. 24, n. 9, p. 1407-1412, 2013/06/12 1990.

BIGATTI, G.; PRIMOST, M. A.; CLEDON, M.; AVERBUJ, A.; THEOBALD, N.; GERWINSKI, W.; ARNTZ, W.; MORRICONI, E.; PENCHASZADEH, P. E. Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 695-701, 2009.

BRAMAN, R. S.; TOMPKINS, M. A. Separation and determination of nanogram amounts of inorganic tin and methyltin compounds in the environment. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 12-19, 2012/10/31 1979.

BURTON, E. D.; PHILLIPS, I. R.; HAWKER, D. W. Tributyltin partitioning in sediments: Effect of aging. **Chemosphere**, v. 63, n. 1, p. 73-81, 2006.

BURTON, G. A.; DENTON, D. L.; HO, K.; IRELAND, S. Sediment toxicity testing: issues and methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A., *et al* (Ed.). **Handbook of Ecotoxicology**. 2. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. cap. 5, p.112-143.

BUSHONG, S. J.; HALL JR, L. W.; SCOTT HALL, W.; EDWARD JOHNSON, W.; HERMAN, R. L. Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay fish and invertebrates. **Water Research**, v. 22, n. 8, p. 1027-1032, 1988.

BUSHONG, S. T.; ZIEGENFUSS, M. C.; UNGER, M. A.; HALL, L. W. Chronic tributyltin toxicity experiments with the Chesapeake Bay copepod *Acartia tonsa*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 359-366, 1990.

CAILLEAUD, K.; MAILLET, G.; BUDZINSKI, H.; SOUSSI, S.; FORGET-LERAY, J. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 4, p. 841-849, 2007.

CARLSON, R. **Primavera Silenciosa**. São Paulo: Melhoramentos, 1962. 327

CARR, R. S.; CHAPMAN, D. C. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests - extraction, storage, and handling techniques. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 69-77, 1995.

CASTRO, I. B.; DE MEIRELLES, C. A. O.; MATTHEWS-CASCON, H.; ROCHA-BARREIRA, C. D.; PENCHASZADEH, P.; BIGATTI, G. Imposex in Endemic Volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1065-1069, 2008.

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

CASTRO, I. B.; ROSSATO, M.; FILLMANN, G. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 947-954, 2012b.

CCME. **Canadian Environmental Quality Guidelines for the protection of aquatic life - Organotin**. Canadian Council of Ministers of the Environment, Canada 1999.

CCME. **Canadian Environmental Quality Guidelines**. http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html. Canadian Council of Ministers of the Environment, Canadá. Data de Acesso: 10/12/2012 2012.

CEC. **Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending directive**. n. 2006/0129. Commission of the European Communities, Belgium 2006.

CHAGOT, D.; ALZIEU, C.; SANJUAN, J.; GRIZEL, H. Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. **Aquat. Living Resour.**, v. 3, p. 121-130, 1990.

CHAMP, M. A. The Status of the Treaty to Ban TBT in Marine Antifouling Paints and Alternatives. 24th UJNR (US/Japan) Marine Facilities Panel Meeting, 2001. Hawaii, Estados Unidos.

CHAMP, M. A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 8, p. 935-940, Aug 2003.

CHANDLER, G. T. High density culture of meiobenthic harpacticoid copepods within a muddy sediment substrate. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 53-59, 1986.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.

CHEUNG, K. C.; WONG, M. H.; YUNG, Y. K. Toxicity assessment of sediments containing tributyltin around Hong Kong harbour. **Toxicology Letters**, v. 137, n. 1-2, p. 121-131, 2003.

COCHRANE, B. J.; IRBY, R. B.; SNELL, T. W. Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 98, n. 2-3, p. 385-390, 1991.

COELHO, M. R.; BEBIANNO, M. J.; LANGSTON, W. J. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. I. Water and sediments as vectors of TBT uptake. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 2, p. 179-192, 2002a.

COELHO, M. R.; BEBIANNO, M. J.; LANGSTON, W. J. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. II. Food as vector of TBT uptake. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 2, p. 193-207, 2002b.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O Futuro Roubado**. Porto Alegre: L&PM, 2002. 354

CONAMA. **Resolução 357 - Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Conselho Nacional de Meio Ambiente, Brasília 2005.

CONAMA. **Resolução 454 - Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional**. . Conselho Nacional de Meio Ambiente, Brasília 2012.

COULL, B. **Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States. Copepoda: Harpacticoida**. National Marine Fisheries Service. 54 p. 1977.

DAHLLOF, I.; AGRENIUS, S.; BLANCK, H.; HALL, P.; MAGNUSSON, K.; MOLANDER, S. The Effect of TBT on the Structure of a Marine Sediment Community - a Boxcosm Study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 689-695, 2001.

DAHMS, P. F. H. U.; QIAN, P. Y. Life histories of the Harpacticoida (Copepoda, Crustacea): a comparison with meiofauna and macrofauna. **Journal of Natural History**, v. 38, n. 14, p. 1725-1734, 2004.

DAY, K. E.; KIRBY, R. S.; REYNOLDSON, T. B. The effect of manipulations of fresh-water sediments on responses of benthic invertebrates in whole-sediment toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 1333-1343, 1995.

DECHO, A. W.; FLEEGER, J. W. Ontogenetic feeding shifts in the meiobenthic harpacticoid copepod *Nitocra lacustris* **Marine Biology**, v. 97, p. 191-197, 1988.

DEFOE, D. L.; ANKLEY, G. T. Influence of storage time on toxicity of freshwater sediments to benthic macroinvertebrates. **Environmental Pollution**, v. 99, n. 1, p. 123-131, 1998.

DI TORO, D. M.; ZARBA, C. S.; HANSEN, D. J.; BERRY, W. J.; SWARTZ, R. C.; COWAN, C. E.; PAVLOU, S. P.; ALLEN, H. E.; THOMAS, N. A.; PAQUIN, P. R. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 1541-1583, 1991.

DÍEZ, S.; ÁBALOS, M.; BAYONA, J. M. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. **Water Research**, v. 36, n. 4, p. 905-918, 2002.

DILLON, T. M.; MOORE, D. W.; JARVIS, A. S. The effects of storage temperature and time on sediment toxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 51-53, 1994.

DIZ, F. R.; ARAÚJO, C. V. M.; MORENO-GARRIDO, I.; HAMPEL, M.; BLASCO, J. Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*: Lethal and reproductive endpoints. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1881-1886, 2009.

DOWSON, P. H.; BUBB, J. M.; LESTER, J. N. Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 42, n. 5, p. 551-562, 1996.

DRILLET, G.; FROUEL, S.; SICHLAU, M. H.; JEPSEN, P. M.; HOJGAARD, J. K.; JOARDER, A. K.; HANSEN, B. W. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. **Aquaculture**, v. 315, n. 3 - 4, p. 155-166, 2011.

DRISCOLL, S. B. K.; SCHAFFNER, L. C.; DICKHUT, R. M. Toxicokinetics of fluoranthene to the amphipod, *Leptocheirus plumulosus*, in water-only and sediment exposures. **Marine Environmental Research**, v. 45, n. 3, p. 269-284, 1998.

EBDON, L.; EVANS, K.; HILL, S. The variation of tributyltin levels with time in selected estuaries prior to the introduction of regulations governing the use of tributyltin-based anti-fouling paints. **Science of the Total Environment**, v. 68, p. 207-223, 1988.

ELSEVIER. **Scopus**. Acessado em 30/10/2012.

EPA. **Trimmed spearman-karber (TSK) program version 1.5 ecological monitoring research division**. United States Environmental Protection Agency 1990.

EPA. **Western Australian water quality guidelines for fresh and marine waters**. Environment Protection Authority, Austrália. n. 711. 1993.

EPA. **Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT) - Final** n. 822-R-03-031. Environmental Protection Agency, Estados Unidos. 2003a.

EPA. **Guidelines for Deriving Numerical National Water Quality Criteria for the Protection Of Aquatic Organisms and Their Uses** n. PB85-227049. Environmental Protection Agency, Estados Unidos. 2003b.

EPA. **Ecotoxicology database**. Acessível em: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>. Environmental Protection Agency, Estados Unidos. 2013a.

EPA. **Water Quality Standards Academy - Aquatic Life Criteria**. Environmental Protection Agency, Estados Unidos. Disponível em: <http://www.epa.gov/>. 2013b.

EVANS, S. M.; NICHOLSON, G. J. The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal waters and open seas. **Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1-2, p. 73-80, 2000.

FEA. **Information System Ecotoxicology and Environmental Quality Targets**. Acessível em: <http://webetox.uba.de/webETOX>. Federal Environmental Agency, Alemanha 2013.

FELIZZOLA, J. F.; WAGENER, A. D. R.; ALMEIDA, A. C.; LIN, W. O. Butyltin speciation in sediments from Todos os Santos Bay (Bahia, Brazil) by GC-PFPD. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 89-93, 2008.

FENT, K. Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. **Science of the Total Environment**, v. 185, n. 1 - 3, p. 151-159, 1996.

FENT, K.; LOOSER, P. W. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: Influence of pH and humic acids. **Water Research**, v. 29, n. 7, p. 1631-1637, 1995.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. M.; DE QUADROS, J. P.; CAMILLO JR, E. An easy, non-destructive, probabilistic method to evaluate the imposex response of gastropod populations. **Marine Environmental Research**, v. 63, n. 1, p. 41-54, 2007.

FERNANDEZ, M. A.; WAGENER, A. D. L. R.; LIMAVERDE, A. M.; SCOFIELD, A. L.; PINHEIRO, F. M.; RODRIGUES, E. Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 59, n. 5, p. 435-452, 2005.

FISHER, D. J.; MCGEE, B. L.; WRIGHT, D. A.; YONKOS, L. T.; ZIEGLER, G. P.; TURLEY, S. D. The Effects of Sieving and Spatial Variability of Estuarine Sediment Toxicity Samples on Sediment Chemistry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 448-455, 2004.

FITRIDGE, I.; DEMPSTER, T.; GUENTHER, J.; DE NYS, R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 649-669, 2012.

GABRIELIDES, G. P.; ALZIEU, C.; READMAN, J. W.; BACCI, E.; ABOUL DAHAB, O.; SALIHOGLU, I. MED POL survey of organotins in the Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 21, n. 5, p. 233-237, 1990.

GADD, G. M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1-2, p. 119-127, 2000.

GEFFARD, O.; BUDZINSKI, H.; HIS, E.; SEAMAN, M. N. L.; GARRIGUES, P. Relationships between contaminant levels in marine sediments and their biological effects on embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 2310-2318, 2002.

GEFFARD, O.; HIS, E.; BUDZINSKI, H.; CHIFFOLEAU, J. F.; COYNEL, A.; ETCHEBER, H. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. **Environmental Pollution**, v. 129, p. 457-465, 2004.

GESAMP. **Scientific aspects of pollution arising from the exploration and exploitation of the sea-bed**. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution n. 7, p.46. 1977.

GESAMP. **The evaluation of hazards of harmful substances carried by ships**. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution n. 17, p.128. 1982.

GESAMP. **The revised GESAMP hazard evaluation procedure for chemical substances carried by ships**. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution n. 64, p.121. 2002.

GESAMP. **Pollution in the open ocean: a review of assessment and related studies**. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution, n. 79, p.68. 2009.

GIRARD, J.-P.; FERRUA, C.; PESANDO, D. Effects of tributyltin on Ca^{2+} homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs. **Aquatic Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 225-239, 1997.

GODOI, A. F. L.; MONTONE, R. C.; SANTIAGO-SILVA, M. Determination of butyltin compounds in surface sediments from the Sao Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 985, n. 1-2, p. 205-210, 2003.

GOLLASCH, S.; LENZ, J.; DAMMER, M.; ANDRES, H.-G. Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from the Indian Ocean to the North Sea. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 5, p. 923-937, May 1, 2000 2000.

GUARD, H. E.; COBET, A. B.; COLEMAN, W. M. Methylation of Trimethyltin Compounds by Estuarine Sediments. **Science**, v. 213, n. 4509, p. 770-771, August 14, 1981 1981.

GURUGE, K. S.; IWATA, H.; TANAKA, H.; TANABE, S. Butyltin accumulation in the liver and kidney of seabirds. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 2, p. 191-199, 1997.

HAGGER, J. A.; DEPLEDGE, M. H.; GALLOWAY, T. S. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 8-12, p. 811-816, 2005.

HAITZER, M.; HOSS, S.; TRAUNSPURGER, W.; STEINBERG, C. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - a review **Chemosphere**, v. 37, n. 7, p. 1335-1362, 1998.

HAKIMZADEH, R.; BRADLEY, B. P. The heat shock response in the copepod *Eurytemora affinis* (POPPE). **Journal of Thermal Biology**, v. 15, n. 1, p. 67-77, 1990.

HALL, L. W.; BUSHONG, S. J.; HALL, W. S.; JOHNSON, E. Acute and chronic effects of tributyltin on a Chesapeake Bay copepod. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 7, p. 41-46, 1988.

HALLAS, L. E.; MEANS, J. C.; COONEY, J. J. Methylation of Tin by Estuarine Microorganisms. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1505-1507, 1982.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays **Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HANSEN, B. H.; ALTIN, D.; VANG, S.-H.; NORDTUG, T.; OLSEN, A. J. Effects of naphthalene on gene transcription in *Calanus finmarchicus* (Crustacea: Copepoda). **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 157-165, 2008.

HANSEN, B. H.; NORDTUG, T.; ALTIN, D.; BOOTH, A.; HESSEN, K. M.; OLSEN, A. J. Gene Expression of GST and CYP330A1 in Lipid-Rich and Lipid-Poor Female *Calanus finmarchicus* (Copepoda: Crustacea) Exposed to Dispersed Oil. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 72, n. 3-4, p. 131-139, 2012/11/29 2009.

HARINO, H.; FUKUSHIMA, M.; KAWAI, S. Temporal trends of organotin compounds in the aquatic environment of the Port of Osaka, Japan. **Environmental Pollution**, v. 105, n. 1, p. 1-7, 1999.

HARINO, H.; FUKUSHIMA, M.; KUROKAWA, Y.; KAWAI, S. Degradation of the tributyltin compounds by the microorganisms in water and sediment collected from the harbour area of Osaka City, Japan. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 2, p. 163-167, 1997.

HICKIE, B. E.; DIXON, D. G.; LEATHERLAND, J. F. The influence of the dietary carbohydrate: lipid ratio on the chronic toxicity of sodium pentachlorophenate to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 175-185, 1989.

HIS, E.; ROBERT, R. Développement des véligères de *Crassostrea gigas* Dans le bassin d'Arcachon études sur les mortalités larvaires **Rev. Trau. Inst. Pêches marit**, v. 47, n. 1-2 p. 63-88, 1985.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 7-8, p. 719-743, 2001.

HOCH, M.; ALONSO-AZCARATE, J.; LISCHICK, M. Adsorption behavior of toxic tributyltin to clay-rich sediments under various environmental conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1390-1397, 2002.

HOCH, M.; SCHWESIG, D. Parameters controlling the partitioning of tributyltin (TBT) in aquatic systems. **Applied Geochemistry**, v. 19, n. 3, p. 323-334, 2004.

HOEKSTRA, P. F.; O'HARA, T. M.; FISK, A. T.; BORGA, K.; SOLOMON, K. R.; MUIR, D. C. G. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. **Environmental Pollution**, v. 124, n. 3, p. 509-522, 2003.

HOLLINGWORTH, R. M.; ROBERT, I. K.; WILLIAM, C. K. Chapter 57 - Inhibitors and Uncouplers of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. In: (Ed.). **Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2001. p.1169-1261. ISBN 978-0-12-426260-7.

HUANG, Y.; ZHU, L.; LIU, G. The effects of bis(tributyltin) oxide on the development, reproduction and sex ratio of calanoid copepod *Pseudodiaptomus marinus*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 69, p. 147-152, 2006.

HUANG, Y.; ZHU, L.; QIU, X.; ZHANG, T. Effect of bis(tributyltin) oxide on reproduction and population growth rate of calanoid copepod *Schmackeria poplesia*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 28, n. 2, p. 280-287, 2010.

IMC. **Hull Roughness Penalty Calculator**. International Marine Coatings Netherlands. 2004.

IMO. **Focus on IMO. Antifouling systems**. Londres. International Maritime Organization 1999.

IMO. **International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships**. London. International Maritime Organization 2001.

IMO. **Status of Conventions**. International Maritime Organization, London, Accessed 19 November 2012 Accessed 19 November 2012, Relatório de 30/10/2012. 2012.

INABA, K.; SHIRAISHI, H.; SOMA, Y. Effects of salinity, pH and temperature on aqueous solubility of four organotin compounds. **Water Research**, v. 29, n. 5, p. 1415-1417, 1995.

JAMES, M. O.; BOYLE, S. M. Cytochromes P450 in crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 121, n. 1-3, p. 157-172, 1998.

JENSEN, H. F.; HOLMER, M.; DAHLLOF, I. Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 7-8, p. 564-573, 2004.

JØRGENSEN, S. E. Ecotoxicological Research - Historical Development and Perspectives. In: SCHUURMAN, G. e MARKERT, B. (Ed.). **Ecotoxicology - Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects**. New York: Wiley-Interscience, 1997. cap. 1, p.3 - 15.

KANNAN, K.; TANABE, S. Global contamination by organotin compounds. In: ARAI, T.; HARINO, H., *et al* (Ed.). **Ecotoxicology of Antifouling biocides**. Tokyo: Springer, 2009. p.39 - 60.

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

KEGLEY, S. E.; HILL, B. R.; ORME, S.; CHOI, A. H. **PAN Pesticide Database**. Pesticide Action Network North America, San Francisco, CA. <http://www.pesticideinfo.org>, Accessed 01 March 2012. 2011.

KENNISH, M. J. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**. Boca Rato, Florida: CRC Press, 1997. 524 p.

KIM, B.-M.; RHEE, J.-S.; PARK, G. S.; LEE, J.; LEE, Y.-M.; LEE, J.-S. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1467-1475, 2011.

KIRSCHNER, C. M.; BRENNAN, A. B. **Bio-inspired antifouling strategies**. Annual Review of Materials Research. 42: 211-229 p. 2012.

KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 235-248, 2004.

KUSK, K. O.; PETERSEN, S. Acute and chronic toxicity tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa* **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1629-1633, 1997.

KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): effects of temperature and salinity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 830-837, 2005.

LANDRUM, P. F.; ROBBINS, J. A. Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In: BAUDO, R.; GIESY, J. P., *et al* (Ed.). **Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants**. Ann Arbor, MI, EUA: Lewis Publishers, 1990. p.pp. 237-263. .

LANGSTON, W. J.; BURT, G. R. Bioavailability and effects of sediment-bound TBT in deposit-feeding clams, *Scrobicularia plana*. **Marine Environmental Research**, v. 32, n. 1-4, p. 61-77, 1991.

LANGSTON, W. J.; POPE, N. D. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 32-43, 1995.

LANGSTON, W. J.; POPE, N. D. Molluscs. In: ARAI, T.; HARINO, H., *et al* (Ed.). **Ecotoxicology of antifouling biocides**. Tokyo: Springer, 2009. p.271 - 289.

LAUGHLIN, R. B.; GUARD, H. E.; COLEMAN, W. M. Tributyltin in seawater: speciation and octanol-water partition coefficient. **Environmental Science & Technology**, v. 20, n. 2, p. 201-204, 2013/02/15 1986.

LAURITANO, C.; PROCACCINI, G.; IANORA, A. Gene expression patterns and stress response in marine copepods. **Marine Environmental Research**, v. 76, n. 0, p. 22-31, 2012.

LEBLANC, G. A. Crustacean endocrine toxicology: a review. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 61-81, 2007.

LEBLANC, G. A.; MCLACHLAN, J. B. Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1450-1455, 1999.

LEE, R. F. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. **Marine Environmental Research**, v. 32, n. 1-4, p. 29-35, 1991.

LEE, W. Y.; YAN, H. Y. Energy budget of the female harpacticoid *Tisbe carolinensis* (Copepoda, Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 109, n. 3, p. 817-820, 1994.

LEE, Y.-M.; PARK, T.-J.; JUNG, S.-O.; SEO, J. S.; PARK, H. G.; HAGIWARA, A.; YOON, Y.-D.; LEE, J.-S. Cloning and characterization of glutathione S-transferase gene in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its expression after exposure to

endocrine-disrupting chemicals. **Marine Environmental Research**, v. 62, Supplement 1, p. S219-S223, 2006.

LIMA, L. C.; SOUZA-SANTOS, L. P. Growth of the brine shrimp *Artemia* fed on offspring of the copepod *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco, 1973. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, n. 1, p. 48-55 2011.

LIMA, L. C. M.; NAVARRO, D. M. A. F.; SOUZA-SANTOS, L. P. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 0, p. 1-10, 2013.

LIMA, L. C. M.; SOUZA-SANTOS, L. P. The ingestion rate of *Litopenaeus vannamei* larvae as a function of *Tisbe biminiensis* copepod concentration. **Aquaculture**, v. 271, n. 1 - 4, p. 411-419, 2007.

LIMAVERDE, A. M.; DE L. REBELLO WAGENER, A.; FERNANDEZ, M. A.; DE L. SCOFIELD, A.; COUTINHO, R. *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 3, p. 384-398, 2007.

LINDEN, E.; BENGTSSON, B. E.; SVANBERG, O.; SUNDSTROM, G.; NATIONAL SWEDISH ENVIRONMENT PROTECTION, B. The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid *Nitocra spinipes*. **Chemosphere**, v. 8, n. 11 -12, p. 843-851, 1979.

LIU, L.-L.; WANG, J.-T.; CHUNG, K.-N.; LEU, M.-Y.; MENG, P.-J. Distribution and accumulation of organotin species in seawater, sediments and organisms collected from a Taiwan mariculture area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5-12, p. 535-540, 2011.

LOOSER, P. W. **Bioconcentration of triorganotin compounds by sediment-dwelling organism (*Chironomus riparius*): assessment of bioavailability, uptake and elimination process**. 2000. 99 p, Federal Institute of Technology, Zürich.

LOTUFO, G. R. Toxicity of sediment-associated PAHs to a estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 4, p. 149-166, Dec 1997.

LOTUFO, G. R. Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. **Aquatic Toxicology**, v. 44, n. 1-2, p. 1-15, 1998a.

LOTUFO, G. R. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. **Aquatic Toxicology**, v. 44, n. 1-2, p. 17-30, 1998b.

LOTUFO, G. R.; FLEEGER, J. W. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. **Marine Ecology Progress Series**, v. 151, p. 91-102, 1997.

MACKEN, A.; GILTRAP, M.; FOLEY, B.; MCGOVERN, E.; MCHUGH, B.; DAVOREN, M. A model compound study: The ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. **Environmental Pollution**, v. 153, n. 3, p. 627-637, 2008.

MAGNUSSON, K.; TISELIUS, P. The importance of uptake from food for the bioaccumulation of PCB and PBDE in the marine planktonic copepod *Acartia clausi*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 4, p. 374-380, 2010.

MAGUIRE, R. J. Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's toxic substances management policy. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 35, n. 4, p. 633-679 2000.

MAGUIRE, R. J.; TKACZ, R. J.; CHAU, Y. K.; BENGERT, G. A.; WONG, P. T. S. Occurrence of organotin compounds in water and sediment in Canada. **Chemosphere**, v. 15, n. 3, p. 253-274, 1986.

MANAHAN, S. E. **Environmental Chemistry**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005. 783 p.

MARTÍ, N.; AGUADO, D.; SEGOVIA-MARTÍNEZ, L.; BOUZAS, A.; SECO, A. Occurrence of priority pollutants in WWTP effluents and Mediterranean coastal waters of Spain. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 3, p. 615-625, 2011.

MCELROY, A. E.; BARRON, M. G.; BECKVAR, N.; KANE DRISCOLL, S. B.; MEADOR, J. P.; PARKERTON, T. F.; PREUSS, T. G.; STEEVENS, J. A. A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 1, p. 50-74, 2011.

MCGEE, B. L.; WRIGHT, D. A.; FISHER, D. J. Biotic Factors Modifying Acute Toxicity of Aqueous Cadmium to Estuarine Amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 34-40, 1998.

MEADOR, J. Rationale and procedures for using the tissue-residue approach for toxicity assessment and determination of tissue, water, and sediment quality guidelines for aquatic organisms. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 12, n. 6, p. 1018-1073, 2006.

MEADOR, J. P. Comparative toxicokinetics of tributyltin in five marine species and its utility in predicting bioaccumulation and acute toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 307-326, 1997.

MEADOR, J. P. Predicting the fate and effects of tributyltin in marine systems. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 166, p. 1-48, 2000.

MEADOR, J. P.; KRONE, C. A.; DYER, D. W.; VARANASI, U. Toxicity of sediment-associated tributyltin to infaunal invertebrates: Species comparison and the role of organic carbon. **Marine Environmental Research**, v. 43, n. 3, p. 219-241, 1997.

MEADOR, J. P.; MCCARTY, L. S.; ESCHER, B. I.; ADAMS, W. J. 10th Anniversary Critical Review: The tissue-residue approach for toxicity assessment: concepts, issues, application, and recommendations. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 12, p. 1486-1498, 2008.

MEADOR, J. P.; VARANASI, U.; KRONE, C. A. Differential sensitivity of marine infaunal amphipods to tributyltin. **Marine Biology**, v. 116, n. 2, p. 231-239, 1993.

MIRANDA, D. A.; YOGUI, G. T. **Determinação gravimétrica de peso seco em amostras de sedimento e tecido biológico**. Procedimento Operacional Padrão OrganoMar-2012-02, Revisão n. 1. Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 7 p. 2012

MOORE, D. W.; BRIDGES, T. S.; GRAY, B. R.; DUKE, B. M. Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 1020-1027, 1997.

MOORE, D. W.; DILLON, T. M.; GAMBLE, E. W. Long-term storage of sediments: Implications for sediment toxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 89, n. 2, p. 147-154, 1995.

MORA, S. J. Tributyltin: case study of an environmental contaminant. **Cambridge Environmental Chemistry Series**, v. 8, 1996.

MORCILLO, Y.; PORTE, C. Evidence of endocrine disruption in clams - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment. **Environmental Pollution**, v. 107, n. 1, p. 47-52, 2000.

MULLER, M. D.; RENBERG, L.; RIPPEN, G. Tributyltin in the environment - sources, fate and determination an assessment of present status and research needs. **Chemosphere**, v. 18, n. 9 -10, p. 2015-2042, 1989.

MURDOCH, M. H.; CHAPMAN, P. M.; NORMAN, D. M.; QUINTINO, V. M. Spiking sediment with organochlorines for toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 1504-1509, 1997.

NEGRI, A.; MARSHALL, P. TBT contamination of remote marine environments: Ship groundings and ice-breakers as sources of organotins in the Great Barrier Reef and Antarctica. **Journal of Environmental Management**, v. 90, Supplement 1, n. 0, p. S31-S40, 2009.

NORMAM. **Controle de sistemas antiincrustantes danosos em embarcações - Normas da Autoridade Marítima** – Brasil. Marinha do Brasil. n. 23 2007.

NORTHCOTT, G. L.; JONES, K. C. Developing a standard spiking procedure for the introduction of hydrophobic organic compounds into field-wet soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2409-2417, 2000a.

NORTHCOTT, G. L.; JONES, K. C. Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment: A review and critique of adopted procedures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2418-2430, 2000b.

OECD. **Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures**. n. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris 2000.

OHJI, M.; TAKEUCHI, I.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; MIYAZAKI, N. Differences in the acute toxicities of tributyltin between the Caprellidea and the Gammaridea (Crustacea : Amphipoda). **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 16-24, 2002.

OLIVEIRA, C. R.; SANTOS, D. M.; MADUREIRA, L. A. S.; MARCHI, M. R. R. Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian Harbors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, n. 851 - 856, p. 851, 2010.

OLIVEIRA, D. D. **Avaliação da sensibilidade do copépodo *Tisbe biminiensis* para testes toxicológicos em água e sedimentos estuarinos**. 2011. 77 p. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

OLIVEIRA, R. C.; SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 9-24, 2010.

ORTIZ, A.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F. J. Effect of triorganotin compounds on membrane permeability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1720, n. 1-2, p. 137-142, 2005.

PELLERITO, L.; NAGY, L. Organotin(IV) complexes formed with biologically active ligands: equilibrium and structural studies, and some biological aspects. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 224, p. 111-150, 2002.

PEREZ-LANDA, V.; BELZUNCE, M.; FRANCO, J. The Effect of Seasonality and Body Size on the Sensitivity of Marine Amphipods to Toxicants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 6, p. 548-552, 2008.

PERINA, F. C. **Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes**. 2009. 112 (Mestrado). Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

PERINA, F. C.; ABESSA, A. M. S.; PINHO, G. L. L.; FILLMANN, G. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 8, p. 1870-1880, 2011.

PINKNEY, A.; MATTESON, L.; WRIGHT, D. Effects of tributyltin on survival, growth, morphometry, and RNA-DNA ratio of larval striped bass, *Morone saxatilis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 235-240, 1990.

PINTO, C. S. C.; SOUZA-SANTOS, L. P.; SANTOS, P. J. P. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. **Aquaculture**, v. 198, p. 253-267, 2001.

PIVER, W. T. Organotin Compounds: Industrial Applications and Biological Investigation. **Environmental Health Perspectives**, v. 4, p. 61-79, 1973.

PLETSCH, A. L.; BERETTA, M.; TAVARES, T. M. Spatial distribution of organic tin compounds in coastal sediment and *Phallusia nigra* of the Todos os Santos Bay and northern coast of Bahia - Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 451-457, 2010.

QUEVAUVILLER, P.; DONARD, O. F. X. Organotin stability during storage of marine waters and sediments. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, n. 1, p. 6-14, 1991.

RADKE, B.; STANISZEWSKA, M.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J.; BOLALEK, J. Organotin Compounds in Marine Sediments. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 17, n. 5, p. 643-654, 2008.

RADKE, B.; WASIK, A.; JEWELL, L. L.; PIKETH, S.; PACZEK, U.; GALUSZKA, A.; NAMIESNIK, J. Seasonal changes in organotin compounds in water and sediment samples from the semi-closed Port of Gdynia. **Science of the Total Environment**, v. 441, n. 0, p. 57-66, 2012.

RANDALL, L.; WEBER, J. H. Adsorptive behavior of butyltin compounds under simulated estuarine conditions. **Science of the Total Environment**, v. 57, n. 0, p. 191-203, 1986.

READER, S.; PELLETIER, E. Biosorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and the associated bacterial community at low temperature. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 599-607, 1992.

REVATHI, P.; MUNUSWAMY, N. Effect of tributyltin on the early embryonic development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Chemosphere**, v. 79, p. 922-927 2010.

RIBEIRO, A. C. B.; SOUZA-SANTOS, L. P. Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. **Aquaculture**, v. 321, n. 3-4, p. 280-288, 2011.

RICE, S. D.; SHORT, J. W.; STICKLE, W. B. Uptake and catabolism of tributyltin by blue crabs fed TBT contaminated prey. **Marine Environmental Research**, v. 27, n. 2, p. 137-145, 1989.

RISTOLA, T. Effect of feeding regime on the results of sediment bioassays and toxicity tests with chironomids. **Annales Zoologici Fennici**, v. 32, n. 3, p. 257-264, 1995.

RUBAL, M.; GUILHERMINO, L. M.; MEDINA, M. H. Two strategies to live in low chronic pollution estuaries: The potential role of lifestyle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1226-1231, 2011.

RUMAMPUK, N. D. C.; RUMENGAN, I. F. M.; OHJI, M.; ARAI, T.; MIYAZAKI, N. Effects of tributyltin on the chlorophyll contents of marine microalga *Tetraselmis tetraele*, *Nannochloropsis oculata* and *Dunaliella* sp. **Coastal marine science**, v. 29, n. 1, p. 40-44, 2004.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

RUSSO, R. C. Development of marine water quality criteria for the USA. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 84-91, 2002.

SAKAMOTO, M.; MURATA, K.; TSURUTA, K.; MIYAMOTO, K.; AKAGI, H. Retrospective study on temporal and regional variations of methylmercury concentrations in preserved umbilical cords collected from inhabitants of the Minamata area, Japan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 6, p. 1144-1149, 2010.

SANTOS, D. M.; ARAUJO, I. P.; MACHADO, E. C.; CARVALHO, M. A. S.; FERNANDEZ, M. A.; MARCHI, M. R. R.; GODOI, A. F. L. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1926-1931, 2009.

SCHULTZ, M. P.; BENDICK, J. A.; HOLM, E. R.; HERTEL, W. M. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. **Biofouling**, v. 27, n. 1, p. 87-98, 2011.

SELIGMAN, P. F.; VALKIRS, A. O.; STANG, P. M.; LEE, R. F. Evidence for rapid degradation of tributyltin in a marina. **Marine Pollution Bulletin**, v. 19, n. 10, p. 531-534, 1988.

SENDA, T. International trends in regulatory aspects. In: ARAI, T.; HARINO, H., *et al* (Ed.). **Ecotoxicology of Antifouling biocides**. Tokyo: Springer, 2009. p.23-34.

SHIMASAKI, Y.; OSHIMA, Y.; INOUE, Y.; SHIBATA, H.; NAKAYAMA, K.; INOUE, S.; IMOTO, H.; KANG, I. J.; HONJO, T. Distribution of Tributyltin in Tissues of Mature Japanese Whiting, *Sillago japonica* and Their Eggs. **J. Fac. Agr., Kyushu Univ.**, v. 53, n. 1, p. 67-72, 2008.

SIDHARTHAN, M.; YOUNG, K. S.; WOUL, L. H.; SOON, P. K.; SHIN, H. W. TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 177-180, 2002.

SMITH, B. S. Tributyltin compounds induced male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Tlyanassa obsoleta*. **Journal Applied Toxicology**, v. 1, n. 3, p. 141-144, 1981.

SNOEIJ, N. J.; PENNINKS, A. H.; SEINEN, W. Biological activity of organotin compounds: An overview. **Environmental Research**, v. 44, n. 2, p. 335-353, 1987.

SOSNOWSKI, S. L.; GERMOND, D. J.; GENTILE, J. H. The effect of nutrition on the response of field populations of the calanoid copepod *Acartia tonsa* to copper. **Water Research**, v. 13, n. 5, p. 449-452, 1979.

SOUZA-SANTOS, L. P.; PASTOR, J. M. O.; FERREIRA, N. G.; COSTA, W. M.; ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SANTOS, P. J. P. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis* culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 15, p. 1516-1523, 2006.

SOUZA-SANTOS, L. P.; SANTOS, P. J. P.; FONSECA-GENEVOIS, V. G. Meiofauna. In: ESKINAZI-LEÇA, E.; NEUMANN-LEITÃO, S., *et al* (Ed.). **Oceanografia: um cenário tropical**. Recife: Bagaço, 2004. p.529-554.

SPRAGUE, J. B.; FOGELS, A. 1977. Watch The Y In Bioassay. Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop, 1976. Halifax, N.S. Environmental Protection Service Technical, Relatório No. EPS-5-AR-77-1. p.107-118.

STOTTRUP, J. G.; NORSEKER, N. H. Production and use of copepods in marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 155, n. 1 - 4, p. 231-247, 1997.

STRONKHORST, J.; VAN HATTUM, B.; BOWMER, T. Bioaccumulation and toxicity of tributyltin to a burrowing heart urchin and an amphipod in spiked, silty marine sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 2343-2351, 1999.

SUBRAMANIAN, R. V. Biologically active organotin polymers. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. VOL. 446, p. 134-148, 1985.

SUDARYANTO, A.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; MUCHTAR, M.; RAZAK, H. Occurrence of butyltin compounds in mussels from Indonesian coastal waters and some Asian countries. **Water Science & Technology**, v. 42, n. 7-8, p. 71-79, 2000.

TANABE, S. Butyltin Contamination in Marine Mammals - A Review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 62-72, 1999.

THOMAS, K. V. The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: A review. **Biofouling**, v. 17, n. 1, p. 73-86, 2001.

TOSTE, R.; FERNANDEZ, M. A.; PESSOA, I. A.; PARAHYBA, M. A.; DORE, M. P. Organotin pollution at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro State, Brazil: increasing levels after the TBT ban. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, n. 1, p. 111-117, 2011.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

TRUJILLO, A. P.; THURMAN, H. V. **Essentials of Oceanography**. 10 th. Prentice Hall, 2011. 551 p.

TSANG, C. K.; LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species. **Environmental Pollution**, v. 105, n. 3, p. 289-297, 1999.

UREN, S. C. Acute toxicity of bis(tributyltin) oxide to a marine copepod. **Marine Pollution Bulletin**, v. 14, n. 8, p. 303-306, 1983.

UHLER, A. D.; DURELL, G. S.; STEINHAEUER, W. G.; SPELLACY, A. M. Tributyltin levels in bivalve mollusks from the east and west coasts of the United States: Results from the 1988–1990 national status and trends mussel watch project. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 139-153, 1993.

UNGER, M. A.; MACINTYRE, W. G.; HUGGETT, R. J. Sorption behavior of tributyltin on estuarine and freshwater sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 907-915, 1988.

USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**, 3th ed., EPA-600/4-85-013. Washington, DC. United States Environmental Protection Agency, Office of Water. EPA-600/4-85-013 1985.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006.

VERRIOPOULOS, G.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. Differentiation of the sensitivity to copper and cadmium in different life stages of a copepod. **Marine Pollution Bulletin**, v. 13, n. 4, p. 123-125, 1982.

VOLKMANN-ROCCO, B. *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the *Gracilis* group. **Archo Oceanogr. Limno.**, v. 18, p. 71-90, 1973.

WALDOCK, M. J.; THAIN, J. Shell thickening in *Crassostrea gigas*: organotin antifouling or sediment induced. **Marine Pollution Bulletin**, v. 14, n. 411 - 415, 1983.

WANG, H.; LI, Y.; HUANG, H.; XU, X.; WANG, Y. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 692-703, 2011a.

WANG, Q.; LI, Y.; WANG, Y. Optimizing the weight loss-on-ignition methodology to quantify organic and carbonate carbon of sediments from diverse sources. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 174, n. 1-4, p. 241-257, Mar 2011b.

WANG, X.; WANG, W.-X. Uptake, absorption efficiency and elimination of DDT in marine phytoplankton, copepods and fish. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 3, p. 453-464, 2005.

WHO. **Tributyltin compounds**. World Health Organization. Geneva, Suíça, Environmental Health Criteria n. 116. 1990.

WILLADINO, L.; SOUZA-SANTOS, L. P.; MÉLO, R. C. S.; BRITO, A. P.; BARROS, N. C. S.; ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; GALVÃO, D. B.; GOUVEIA, A.; REGIS, C. G.; CAVALLI, R. O. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v. 360-361, n. 0, p. 10-16, 2012.

YAMADA, H.; TAKAYANAGI, K.; TATEISHI, M.; TAGATA, H.; IKEDA, K. Organotin compounds and polychlorinated biphenyls of livers in squid collected from coastal waters and open oceans. **Environmental Pollution**, v. 96, n. 2, p. 217-226, 1997.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2008. 486

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis, fourth ed.** New Jersey: Prentice-Hall International Press, 1999.

ZHANG, Q.; YANG, L.; WANG, W.-X. Bioaccumulation and trophic transfer of dioxins in marine copepods and fish. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 12, p. 3390-3397, 2011.

9. ANEXOS

Revisão da CL₅₀ dos compostos de TBT agrupados por espécie. Legenda: Amb.: Ambiente (E – estuarino, M – marinho, D – dulcícola); EV – estágio de vida; TT – tipo de teste (E – estático, SE – semi-estático, F – fluxo contínuo); Ânion: grupo aniônico ligado ao TBT; CL₅₀: concentração letal a 50% dos organismos expostos (µg L⁻¹); TE – tempo de exposição (dias).

Classe	Ordem	Espécie	Hábito	Amb.	EV	TT	Ânion	CL ₅₀	TE	Referência
Copepoda	Harpacticoida	<i>Tisbe biminiensis</i>	Epibentônico	M	Adulto	E	Óxido	38	1	Presente trabalho
						E	Óxido	37	2	Presente trabalho
		<i>Nitocra spinipes</i>	Bentônico	E	Adulto	E	Óxido	2	4	Kegley et al. (2011)
							Óxido	13	4	Karlsson et al. (2006)
						E	Fluoreto	0,8	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Tigriopus japonicus</i>	Planctônico	M	NR	SE	Cloreto	0,15	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	E		50	4	Lee et al. (2007)
					Adulto	SE	Cloreto	0,149	4	Kwok e Leung (2005)
					Adulto	E	Cloreto	0,96	2	Ara et al. (2010)
					Adulto	E	Cloreto	0,58	2	Ara et al. (2010)
	Calanoida	<i>Eurytemora affinis</i>	Epibentônico	E/M	Adulto	F	Cloreto	0,6	3	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	2,2	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	1,4	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	2,5	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	0,6	3	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	0,5	3	Kegley et al. (2011)
		<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	Planctônico	E	Adulto	E	Óxido	1,23	2	Huang et al. (2006)
					Adulto	E	Óxido	0,57	4	Huang et al. (2006)
		<i>Acartia tonsa</i>	Planctônico	E/M	Adulto	SE	Óxido	0,55	6	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Óxido	0,75	5	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Óxido	1	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Óxido	2,1	3	Kegley et al. (2011)
					NR	E	Óxido	1	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	1,1	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	E	Cloreto	0,47	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	E	Cloreto	0,24	2	Kegley et al. (2011)

Classe	Ordem	Espécie	Hábito	Amb.	EV	TT	Ânion	CL ₅₀	TE	Referência
Malacostraca	Mysidacea	<i>Americamysis bahia</i>	Bentônico	E/M	1-4 d	E	Metacrilato	3,2	4	Kegley et al. (2011)
					6-8 d	E	Metacrilato	89	4	Kegley et al. (2011)
					<=1 D	F	Cloreto	1,1	4	Kegley et al. (2011)
					5 D	F	Cloreto	2	4	Kegley et al. (2011)
					10 D	F	Cloreto	2,2	4	Kegley et al. (2011)
					1-4 d	E	Óxido	3,2	4	Kegley et al. (2011)
							Óxido	0,12	31	Kegley et al. (2011)
		<i>Metamysidopsis elongata</i>	Bentônico	M		SE	Óxido	2	4	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	1	6	Kegley et al. (2011)
	Amphipoda	<i>Hyaella azteca</i>	Bentônico	E/D	Adulto	E	Cloreto	5,6	7	Kegley et al. (2011)
					Adulto	E	Cloreto	7,23	7	Kegley et al. (2011)
					Adulto	E	Cloreto	6,09	7	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Cloreto	1,46	7	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Cloreto	2,54	7	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Cloreto	1,17	28	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Cloreto	1,76	28	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Cloreto	1,79	28	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Cloreto	2,73	7	Kegley et al. (2011)
		<i>Corophium volutator</i>	Bentônico	E	Adulto	L	Cloreto	0,33	10	Kegley et al. (2011)
		<i>Gammarus sp.</i>	Bentônico	E	Jovem	F	Cloreto	12,5	2	Kegley et al. (2011)
					Jovem	F	Cloreto	4,3	3	Kegley et al. (2011)
					Jovem	F	Cloreto	1,3	4	Kegley et al. (2011)
					Aulto	F	Cloreto	20,2	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	10,1	3	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	5,3	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	Bentônico	E		F	Óxido	3,7	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Eohaustorius estuarius</i>	Bentônico	E	Adulto	SE	Cloreto	2	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	1,5	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Eohaustorius washingtonianus</i>	Bentônico	E	Adulto	SE	Cloreto	1,7	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	1,5	10	Kegley et al. (2011)

Classe	Ordem	Espécie	Hábito	Amb.	EV	TT	Ânion	CL ₅₀	TE	Referência
Malacostraca	Amphipoda	<i>Rhepoxynius abronius</i>	Bentônico	M	Adulto	SE	Cloreto	32,1	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	29,8	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	22,8	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	14,2	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	11	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	138	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	173	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	51	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	27	10	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	90	7	Kegley et al. (2011)
	Decapoda	<i>Palaemonetes sp.</i>	Bentônico	E/D	Adulto	F	Cloreto	32,2	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	31	3	Kegley et al. (2011)
					Adulto	F	Cloreto	31	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Palaemonetes pugio</i>	Bentônico	M	Adulto	F	Óxido	20	4	Kegley et al. (2011)
					Larva	SE	Óxido	4,07	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Óxido	31,4	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Carcinus maenas</i>	Bentônico	M		SE	Óxido	10	4	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	110	2	Kegley et al. (2011)
		<i>Crangon crangon</i>	Bentônico	M		SE	Óxido	41	4	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	1,5	4	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	73	2	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	6,5	2	Kegley et al. (2011)

Classe	Ordem	Espécie	Hábito	Amb.	EV	TT	Ânion	CL ₅₀	TE	Referência
Malacostraca	Decapoda	<i>Penaeus duorarum</i>	Bentônico	E/M	20-35 MM	E	Óxido	11	4	Kegley et al. (2011)
					20-35 MM	E	Óxido	13	2	Kegley et al. (2011)
					20-35 MM	E	Óxido	15	1	Kegley et al. (2011)
						E	Óxido	11	4	Kegley et al. (2011)
						E	Óxido	9,1	4	Kegley et al. (2011)
						E	Óxido	7,6	4	Kegley et al. (2011)
							Óxido	9,1	4	Kegley et al. (2011)
							Óxido	7,6	4	Kegley et al. (2011)
					15 mm	E	Metacrilato	106	4	Kegley et al. (2011)
						E	Fluoreto	12,7	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Penaeus japonicus</i>	Bentônico	E/M	Larva	E	Óxido	5,3	1	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	0,7	2	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	1,4	2	Kegley et al. (2011)
					Jovem	E	Óxido	6,8	2	Kegley et al. (2011)
					Jovem	E	Óxido	25,7	2	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Óxido	19,4	4	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Óxido	93,6	4	Kegley et al. (2011)
					Jovem	E	Óxido	773	1	Kegley et al. (2011)
					Jovem	E	Óxido	708	2	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Óxido	370	4	Kegley et al. (2011)
					Jovem	E	Óxido	798	1	Kegley et al. (2011)
					Jovem	E	Óxido	510	2	Kegley et al. (2011)
					Jovem	SE	Óxido	328	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Bentônico	E	Larva	SE	Óxido	27,4	NR	Kegley et al. (2011)
					Larva	SE	Óxido	31,9	NR	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	13	NR	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	33,6	NR	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	32,8	11	Kegley et al. (2011)
		<i>Uca pugilator</i>	Bentônico	E/M	Adulto	E	Óxido	7,300	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	E	Fluoreto	800	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Callinectes sapidus</i>	Bentônico	M		E	Metacrilato	3,100	4	Kegley et al. (2011)
		<i>Streptocephalus rubricaudatus</i>	Bentônico	M	Larva		Cloreto	53	1	Kegley et al. (2011)
		<i>Streptocephalus texanus</i>	Bentônico	M	Larva		Cloreto	15	1	Kegley et al. (2011)

Classe	Ordem	Espécie	Hábito	Amb.	EV	TT	Ânion	CL ₅₀	TE	Referência
Cirripedia	Cirripedia	<i>Balanus amphitrite</i>	Bentônico	M	Larva	E	Óxido	0,71	1	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	300	1	Kegley et al. (2011)
						F	Óxido	3,5	28	Kegley et al. (2011)
						E	Cloreto	2	1	Kegley et al. (2011)
Branchiopoda	Cladocera	<i>Daphnia magna</i>	Planctônico	D			Benzoato	4,4	2	Kegley et al. (2011)
							Acetato	3,3	2	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	1,67	2	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Óxido	8,58	1	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	3,2	7	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	2,4	14	Kegley et al. (2011)
						SE	Óxido	1,8	20	Kegley et al. (2011)
							Óxido	1,67	2	Kegley et al. (2011)
							Óxido	3	2	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	5,9	4	Kegley et al. (2011)
					Adulto	SE	Cloreto	3,4	5	Kegley et al. (2011)
							Cloreto	5	2	Kegley et al. (2011)
							Cloreto	5,9	4	Kegley et al. (2011)
							Cloreto	3,4	5	Kegley et al. (2011)
						E	Cloreto	0,95	1	Kegley et al. (2011)
							Naftenato	150	1	Kegley et al. (2011)
							Naftenato	14	2	Kegley et al. (2011)
	Anostraca	<i>Artemia salina</i>	Planctônico	M	Larva	E	Metacrilato	124	2	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Metacrilato	63	2	Kegley et al. (2011)
					Larva		Cloreto	220	1	Kegley et al. (2011)
						E	Cloreto	281	1	Kegley et al. (2011)
					Larva	E	Acrilato	123,5	2	Kegley et al. (2011)