

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA FÍSICA, QUÍMICA E GEOLÓGICA**

**Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-
incrustantes**

FERNANDO CESAR PERINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica.

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Fillmann
Co-orientadora: Profa. Dra. Grasiela L. L. Pinho**

**RIO GRANDE
2009**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTADE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
Ecotoxicologia Aquática	4
Incrustação Marinha	7
Desenvolvimento das Tintas Anti-incrustantes e suas Implicações Ambientais	8
Aspectos Legais Envolvendo os Anti-incrustantes	12
III. COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTUDO.....	15
Compostos Organoestânicos – Tributilestanho (TBT) e Trifenilestanho (TPT).....	15
Irgarol 1051	16
Diuron.....	17
IV. OBJETIVOS	20
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO 1	21
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM MATRIZES AQUOSAS	21
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
1.2.1 Organismos-teste.....	23
1.2.1.1 <i>Acartia tonsa</i>	23
1.2.1.2 <i>Mysidopsis juniae</i>	24
1.2.1.3 <i>Kalliapseudes shubartii</i>	24
1.2.2 Manutenção dos cultivos	26
1.2.2.1 Cultivo de <i>Acartia tonsa</i>	26
1.2.2.2 Cultivos de <i>Thalassiosira weissflogii</i> e <i>Isochrysis galbana</i>	27
1.2.2.3 Cultivo de <i>Mysidopsis juniae</i>	28
1.2.3 Coleta e Aclimatação dos Organismos.....	28
1.2.3.1 <i>Kalliapseudes schubartii</i>	28
1.2.4 Preparo das soluções de exposição	29

1.2.4.1	Soluções-estoque de TBT e TPT.....	29
1.2.4.2	Soluções-estoque de Irgarol 1051 e Diuron	29
1.2.4.3	Soluções de exposição	30
1.2.5	Determinação das concentrações por análises químicas	30
1.2.6	Lavagem do material utilizado	30
1.2.7	Ensaio de toxicidade.....	31
1.2.7.1	Ensaio preliminares – Toxicidade dos solventes.....	31
1.2.7.2	Ensaio preliminares – Determinação das faixas de concentração.....	31
1.2.7.3	Ensaio com substância de referência.....	31
1.2.7.4	Ensaio toxicológico com o copépodo eurialino <i>Acartia tonsa</i>	32
1.2.7.5	Ensaio toxicológico com o misídeo <i>Mysidopsis juniae</i>	33
1.2.7.6	Ensaio toxicológico com o tanaidáceo <i>Kalliapseudes schubartii</i>	33
1.2.8	Análises Estatísticas	34
1.3	RESULTADOS	35
1.3.1	Sensibilidade dos organismos aos solventes	35
1.3.2	Ensaio com substância de referência	35
1.3.3	Ensaio de toxicidade com os compostos anti-incrustantes.....	37
1.3.3.1	<i>Acartia tonsa</i>	37
1.3.3.2	<i>Mysidopsis juniae</i>	38
1.3.3.3	<i>Kalliapseudes schubartii</i>	38
1.4	DISCUSSÃO.....	40
CAPÍTULO 2		49
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA EM MATRIZES AQUOSAS		49
2.1	INTRODUÇÃO.....	49
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.2.1	Organismo-teste (<i>Lytechinus variegatus</i>)	51
2.2.2	Coleta e Aclimação dos Organismos.....	51
2.2.3	Ensaio Toxicológicos.....	51
2.2.3.1	Ensaio com substância de referência.....	51
2.2.3.2	Ensaio de toxicidade crônica com embriões de <i>Lytechinus variegatus</i>	52
2.2.3.2.1	Obtenção dos gametas	52
2.2.3.2.2	Tratamento dos gametas	53
2.2.3.2.2.1	Óvulos.....	53
2.2.3.2.2.2	Espermatozoides	53
2.2.3.2.3	Fecundação e obtenção dos ovos para os experimentos	53
2.2.3.2.4	Preparo das amostras	54
2.2.3.2.5	Encerramento do teste de toxicidade.....	54
2.2.3.2.6	Avaliação das amostras e interpretação	54
2.2.3.3	Aceitabilidade dos ensaios de toxicidade.....	55
2.2.4	Análises Estatísticas	56

2.3	RESULTADOS	57
2.3.1	Crítérios de aceitabilidade dos ensaios.....	57
2.3.1.1	Controle negativo.....	57
2.3.1.2	Ensaio com substância de referência.....	58
2.3.2	Ensaio com os compostos anti-incrustantes	58
2.3.2.1	Estimativa das Concentrações de Inibição (CI50 – 24h)	58
2.3.2.2	Identificação dos diferentes estágios embrio-larvais.....	62
2.4	DISCUSSÃO.....	64
CAPÍTULO 3		69
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM SEDIMENTO		69
3.1	INTRODUÇÃO.....	69
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	73
3.2.1	Organismo-teste	73
3.2.1.1	<i>Tiburonella viscana</i>	73
3.2.2	Coleta e Aclimação dos Organismos.....	73
3.2.3	Ensaio com substância de referência	74
3.2.4	Ensaio de Toxicidade Aguda com sedimento contaminado em laboratório.....	74
3.2.5	Preparo do sedimento para posterior contaminação.....	74
3.2.6	Determinação do teor de umidade do sedimento.....	75
3.2.7	Contaminação dos sedimentos.....	75
3.2.8	Ensaio de toxicidade aguda com o Anfípodo <i>Tiburonella viscana</i>	76
3.2.9	Análises sedimentológicas	77
3.2.9.1	Teor de carbonato total	77
3.2.9.2	Análise granulométrica	77
3.2.9.3	Quantificação de matéria orgânica	78
3.2.10	Análises Estatísticas	78
3.3	RESULTADOS	79
3.3.1	Crítérios de aceitabilidade dos ensaios.....	79
3.3.1.1	Controle negativo.....	79
3.3.1.2	Ensaio com substância de referência.....	80
3.3.2	Ensaio com os compostos anti-incrustantes	80
3.3.3	Variáveis físico-químicas dos ensaios	80
3.3.4	Análises sedimentológicas	80
	DISCUSSÃO	81
V. CONCLUSÕES		85
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS		87
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tributilestanho e Trifenilestanho e seus respectivos produtos de desbutilação e desfenilação. X=espécie aniônica (ex: cloreto, óxido, hidróxido).....	16
Figura 2: Fórmula estrutural do Irgarol 1051.....	16
Figura 3: Fórmula estrutural do Diuron	17
Figura 4: Controle da sensibilidade do cultivo de <i>Acartia tonsa</i> à substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). A linha contínua representa a média acumulada das CL50 - 48h (n=12) e as linhas tracejadas os respectivos limites inferiores e superiores (± 2 desvio padrão).....	36
Figura 5: Controle da sensibilidade de <i>Kalliapseudes schubartii</i> à substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). A linha contínua representa a média acumulada das CL50 - 96h (n=40) e as linhas tracejadas os respectivos limites inferiores e superiores (± 2 desvio padrão).....	37
Figura 6: Relação concentração-resposta entre os compostos anti-incrustantes e a espécie <i>Acartia tonsa</i> . Os valores a direita das curvas são os valores médios das CL50 \pm desvio padrão.....	43
Figura 7: Ajuste linear da relação concentração-resposta para a espécie <i>Acartia tonsa</i> frente aos compostos Irgarol 1051 e Diuron.	44
Figura 8: Relação concentração-resposta entre os compostos anti-incrustantes e <i>Mysidopsis juniae</i>	45
Figura 9: Ovo fecundado de <i>Lytechinus variegatus</i>	54
Figura 10: Estágios do desenvolvimento embrio-larval de <i>Lytechinus variegatus</i>	55
Figura 11: Valores médios de larvas <i>pluteus</i> normais observados nos Controles experimentais com água de diluição e 0,05% de acetona utilizados nos ensaios com <i>Lytechinus variegatus</i> . EP e DP correspondem ao erro padrão e desvio padrão, respectivamente.	57
Figura 12: Percentual médio de larvas <i>pluteus</i> normais de <i>Lytechinus variegatus</i> observados nas diferentes concentrações de TBT. As barras de erro correspondem a desvio padrão.	59
Figura 13: Percentual médio de larvas <i>pluteus</i> normais de <i>Lytechinus variegatus</i> observados nas diferentes concentrações de TPT. As barras de erro correspondem a desvio padrão.	60
Figura 14: Percentual médio de larvas <i>pluteus</i> normais de <i>Lytechinus variegatus</i> observados nas diferentes concentrações de Irgarol 1051. Os símbolos em branco e preto representam diferentes ensaios. As barras de erro correspondem a desvio padrão.....	61
Figura 15: Percentual médio de larvas <i>pluteus</i> normais de <i>Lytechinus variegatus</i> observados nas diferentes concentrações de Diuron. Os símbolos em branco e preto representam diferentes ensaios. As barras de erros correspondem a desvio padrão.	61
Figura 16: Percentual médio de sobrevivência entre os dois Controles experimentais utilizados nos ensaios com <i>Tiburonella viscana</i> . EP e DP correspondem ao erro padrão e desvio padrão, respectivamente.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies utilizadas em ensaios ecotoxicológicos normatizadas por entidades internacionais.....	6
Tabela 2: Espécies utilizadas em ensaios ecotoxicológicos normatizadas por órgãos nacionais.	7
Tabela 3: Cronologia resumida das principais restrições relativas ao uso de COEs no mundo (modificado de IMO, 2000b; e Walmsley, 2002).	14
Tabela 4: Informações gerais e propriedades físico-químicas dos compostos selecionados para estudo.	18
Tabela 5: Condições gerais para o cultivo de <i>Acartia tonsa</i>	26
Tabela 6: Condições gerais para cultivo de <i>Thalassiosira weissflogii</i> e <i>Isochrysis galbana</i>	27
Tabela 7: Condições gerais para o cultivo de <i>Mysidopsis juniae</i>	28
Tabela 8: Percentual de sobrevivência dos organismos aos solventes etanol e acetona, após 48 horas de exposição para <i>Acartia tonsa</i> e 96 horas de exposição para <i>Mysidopsis juniae</i> e <i>Kalliapseudes schubartii</i>	35
Tabela 9: Resultados obtidos a partir dos ensaios agudos de toxicidade com Dodecil sulfato de Sódio, para as espécies <i>Acartia tonsa</i> , <i>Mysidopsis juniae</i> e <i>Kalliapseudes schubartii</i> , no período de execução deste trabalho.....	36
Tabela 10: Resultados de CL50 obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie <i>Acartia tonsa</i> frente aos compostos anti-incrustantes.....	37
Tabela 11: Resultados de CL50 obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie <i>Mysidopsis juniae</i> frente aos compostos anti-incrustantes.....	38
Tabela 12: Resultados de CL50 obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie <i>Kalliapseudes schubartii</i> frente aos compostos anti-incrustantes.	39
Tabela 13: Valores médios de CI50 - 24 h dos ensaios com as substâncias de referência sulfato de zinco heptahidratado e dicromato de potássio sobre <i>Lytechinus variegatus</i>	58
Tabela 14: Resultados de CI50 obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie <i>Lytechinus variegatus</i> frente aos compostos anti-incrustantes.	58
Tabela 15: Principais estágios de desenvolvimento embrio-larval de <i>Lytechinus variegatus</i> observados nas concentrações de exposição aos compostos organoestânicos.....	63
Tabela 16: Principais estágios de desenvolvimento embrio-larval de <i>Lytechinus variegatus</i> observados nas concentrações de exposição aos compostos Irgarol 1051 e Diuron.....	63
Tabela 17: Resultados das CL50 – 10d para <i>Tiburionella viscana</i> calculadas com base nas concentrações nominais dos compostos anti-incrustantes em sedimento.....	80

RESUMO

As tintas à base de compostos orgânicos de estanho (COEs), como TBT (Tributilestanho) e TPT (Trifenilestanho), são altamente efetivas contra a bioincrustação. No entanto, devido aos efeitos danosos ao ambiente, em janeiro de 2008 estes compostos foram banidos das tintas anti-incrustantes. Deste modo, diferentes compostos orgânicos, como os herbicidas Irgarol 1051 e Diuron, estão sendo utilizados como biocidas principais das tintas ou como aditivos para potencializar os efeitos de outras substâncias presentes nas formulações. Apesar disso, não há registro de estudos utilizando espécies nativas da costa brasileira na avaliação da toxicidade de compostos anti-incrustantes. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar isoladamente a toxicidade dos principais biocidas utilizados como anti-incrustantes, tanto dos recentemente banidos TBT e TPT, quanto dos substitutos Irgarol 1051 e Diuron. Através de ensaios com diferentes espécies animais foram avaliadas: (1) Toxicidade aguda em matriz aquosa (água do mar filtrada), utilizando os organismos costeiros *Kalliapseudes schubartii*, *Acartia tonsa* e *Mysidopsis juniae*; (2) Toxicidade crônica, através de ensaios de toxicidade com embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e identificação de efeitos sobre os estágios embrio-larvais; e (3) Toxicidade aguda em sedimentos (fase sólida), utilizando o anfípodo escavador *Tiburonella viscana*. Os resultados dos ensaios em matrizes aquosas mostraram o mesmo padrão de toxicidade para todas as espécies estudadas, sendo: TBT > TPT > Irgarol 1051 > Diuron. Além disso, os organismos genuinamente de coluna d'água se mostraram altamente sensíveis ao TBT e TPT, com respectivos valores médios das CL₅₀ - 48 h de 1,5 e 2,8 µg L⁻¹ para *A. tonsa*, e CL₅₀ - 96 h de 2,8 e 4,2 µg L⁻¹ para *M. juniae*, que equivalem aos níveis já reportados para amostras ambientais de água. Já para o tanaidáceo bentônico *K. schubartii* as CL₅₀ - 96 h foram de 23,5 µg L⁻¹ para TBT e de 34,0 µg L⁻¹ para TPT. Diferente do observado nos ensaios com matrizes aquosas, em sedimentos o TPT foi mais tóxico para *T. viscana* que o TBT, com CL₅₀ - 10 d de 1,2 e 1,7 µg g⁻¹, respectivamente. Níveis de TBT nesta faixa de concentração já foram registrados em sedimentos da costa brasileira, o que sugere comprometimento ecológico dessas áreas. Já ensaios (agudos e crônicos) com Irgarol e Diuron indicaram que os níveis ambientais reportados, tanto em coluna d'água quanto em sedimentos, são inferiores aos que causaram toxicidade às espécies estudadas. Considerando a legislação ambiental brasileira, os ensaios crônicos mostraram que a concentração máxima de TBT apresentada pela resolução CONAMA 357/2005 é suficiente para inviabilizar o desenvolvimento embrionário de *L. variegatus*. Deste modo, destaca-se a importância de avaliar a toxicidade dos contaminantes sobre espécies nativas, como subsídios para a inclusão de limites seguros nas legislações ambientais. Em linhas gerais, as espécies utilizadas mostraram-se adequadas para avaliar a toxicidade dos compostos anti-incrustantes na costa brasileira.

ABSTRACT

Organotin-based (OTs) antifouling paints, such as TBT (tributyltin) and TPT (triphenyltin), are highly effective against most fouling organisms. However, use of OTs in antifouling paints was worldwide banned in January 2008, in response to toxicity and harmful effects to aquatic environment. Since the ban of OTs in antifouling paints, new organic compounds (i.e. Irgarol 1051 and Diuron) have been introduced in antifouling paint formulations, either as principal or booster biocides. In Brazil, there are no studies evaluating the toxicity of both new and old antifouling compounds to native species. Therefore, the aim of this work was to investigate single toxicity of four of the most widely used antifouling biocides (TBT, TPT, Irgarol 1051 and Diuron). The toxic effects of these compounds were performed by using different bioassays to assess the: (1) Acute toxicity (in filtered seawater) using the coastal marine organisms *Kalliapseudes schubartii*, *Acartia tonsa* and *Mysidopsis juniae*; (2) Chronic toxicity using *Lytechinus variegatus* embryo-larval bioassay and analysis of their early developmental stages; and (3) Sediment toxicity using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana*. For the studied species, the toxicity pattern was: TBT > TPT > Irgarol 1051 > Diuron. The planktonic organisms were highly sensitive to OTs. The 48h-LC₅₀ for *A. tonsa* was estimated as 1.5 µg L⁻¹ for TBT and 2.8 µg L⁻¹ for TPT, while for *M. juniae* the 96h-LC₅₀ values were 2.8 for TBT and 4.2 µg L⁻¹ for TPT, which is in the same reported environmental levels. However, the 96h-LC₅₀ for *K. schubartii* was 23.5 µg L⁻¹ for TBT and 34.0 µg L⁻¹ for TPT. In whole sediment toxicity tests, TPT was more toxic than TBT for *T. viscana*, showing a 10 day-LC₅₀ of 1.2 and 1.7 µg g⁻¹, respectively. Since TBT concentrations at this level have been reported for the Brazilian coastal sediments, the amphipod population of those sites might be at risk. On contrary, toxicity tests (acute and chronic) with Irgarol and Diuron indicated that levels reported for the environmental, both for water column and sediment, are lower than those that caused toxicity. Nevertheless, the results of chronic toxicity bioassays showed that TBT levels established by the Brazilian legislation (CONAMA 357/2005) are sufficient to affect the embryonic development of *L. variegatus*. These results highlight the importance of assessing the toxicity of contaminants on native species as a way to include safe concentration to the environmental legislation. In general, the species used were suitable to evaluate the toxicity of antifouling in environmental samples.

I. INTRODUÇÃO

Historicamente, o homem tem utilizado os corpos d'água como receptores de seus resíduos. As gestões inadequadas das atividades industriais e portuárias, desacompanhadas de infra-estrutura de saneamento ambiental, têm levado a um aumento nos níveis de contaminação pelo lançamento de resíduos nos ecossistemas aquáticos. Adicionalmente, as regiões costeiras, tendem a apresentar uma intensa ocupação humana, ocasionando forte pressão sobre os ecossistemas que aí se encontram. No Brasil, das 25 regiões metropolitanas, 14 estão situadas em estuários, onde se localizam os principais pólos petroquímicos e sistemas portuários do país (Lamparelli *et al.*, 2001).

Dentre as principais atividades antrópicas impactantes, os portos representam um importante fator de risco às zonas costeiras, tanto pela sua implantação, quanto por suas atividades operacionais (PNMA, 1996). As atividades de dragagem realizadas nos canais de navegação destacam-se por promover a ressuspensão dos contaminantes depositados junto aos sedimentos de fundo. Além disso, podem gerar impactos que extrapolam as áreas autorizadas para extração e disposição dos sedimentos, pois através do carreamento pelas correntes marítimas podem contaminar ecossistemas adjacentes.

Substâncias químicas oriundas das embarcações que operam em portos, marinas e docas também contribuem de forma expressiva para a degradação ambiental. Dentre elas, certos compostos presentes nas tintas anti-incrustantes, requerem grande atenção e cuidado por apresentarem ação biocida. A finalidade destes biocidas é impedir a aderência e o crescimento de organismos vivos em superfícies com contato direto e prolongado com a água (Almeida *et al.*, 2007). Vários estudos têm sido realizados nas mais diversas áreas com o intuito de avaliar o impacto provocado por biocidas oriundos de tintas anti-incrustantes. A maioria destes estudos envolve determinações químicas para quantificar a presença em matrizes ambientais como água, sedimentos e biota (Hoch, 2001; Konstantinou & Albanis, 2004; Langston *et al.*, 2009; Thomas & Langford, 2009; Harino *et al.*, 2009). Adicionalmente, avaliações da toxicidade desses compostos sobre diversos organismos também têm sido realizadas, sendo comprovado que muitos destes compostos apresentam toxicidade para espécies não-alvo (ver os trabalhos de revisão de Fent, 1996a; Champ, 2000; Mochida & Fujii, 2009a; Mochida & Fujii, 2009b).

Os agentes anti-incrustantes que receberam maior atenção quanto ao seu impacto ambiental foram os compostos organoestânicos (COEs), tais como o tributilestanho (TBT - do inglês *tributyltin*) e o trifenilestanho (TPT - do inglês *triphenyltin*). Aproximadamente 20 anos após sua introdução foi comprovado que as tintas contendo COEs exerciam efeitos adversos aos organismos marinhos (Alzieu *et al.*, 1982; Waldock & Thain, 1983; Waldock *et al.*, 1987; Ritsema *et al.*, 1991; tenHallersTjabbes *et al.*, 1996). Exemplos importantes destes

efeitos adversos e suas respectivas concentrações de COEs são: alteração no crescimento larval da ostra *Crassostrea gigas* (20 ng L⁻¹), inibição da calcificação das conchas para esta mesma espécie (2 ng L⁻¹) (Alzieu *et al.*, 1986) e indução de imposex (desenvolvimento de características sexuais masculinas em fêmeas de gastrópodes) na espécie *Nucella* sp. (~1 ng L⁻¹) (Bryan *et al.*, 1987).

Como consequência dos impactos ambientais, restrições ao uso de TBT foram adotadas na década de 1980 primeiramente pela França, seguida pelo Reino Unido e, posteriormente, em vários países do hemisfério norte (Yebra *et al.*, 2004). Não obstante, devido à alta toxicidade dos COEs reportados mundialmente, foi determinado o banimento mundial destes compostos a partir de janeiro de 2008 (estes aspectos estão apresentados em detalhe no item 2.4 deste trabalho).

Embora a determinação para o banimento global do TBT em tintas anti-incrustantes tenha entrado em vigor, trabalhos recentes demonstram que as tintas com estes compostos continuam sendo utilizadas, principalmente nos países em desenvolvimento (Shim *et al.*, 2005; Kotrikla, 2009). Segundo Kotrikla (2009), existe a possibilidade de que uma boa parte da frota de embarcações no mundo ainda apresente coberturas de tintas a base de COEs. Tal fato é atribuído à falta de regulamentações em países que não são signatários da Organização Marítima Internacional (IMO), à falta de fiscalização e à baixa eficiência das novas tintas anti-incrustantes (Chambers *et al.*, 2006). Além disso, utilização de COEs na agricultura e em uma variedade de processos industriais continuam a produzir resíduos que necessitam de atenção (Omae, 2003)

Adicionalmente, devido à obrigatoriedade da substituição das camadas de tintas contendo COEs pelos anti-incrustantes alternativos (IMO, 2000a), existe uma preocupação relativa aos resíduos gerados no processo de substituição que fatalmente atingirão ambientes próximos a estaleiros, principalmente durante os meses subseqüentes ao banimento mundial (Kotrikla, 2009). Portanto, devem ser esperados altos níveis destes compostos no ambiente, principalmente nos sedimentos (Langston & Pope, 1995; Hoch, 2001; Hoch & Schwesig, 2004; Langston *et al.*, 2009).

A proibição mundial dos COEs proposta pela IMO foi o determinante principal no esforço para se designar novos anti-incrustantes ambientalmente menos severos. As alternativas aos COEs incluem tintas à base de cobre, contendo aditivos biocidas tais como o Irgarol 1051 e o Diuron (Voulvoulis *et al.*, 1999; Chambers *et al.*, 2006). Entretanto, apesar de trabalhos recentes terem sido conduzidos para elucidar a ocorrência e destino destes compostos no ambiente, a disponibilidade de dados sobre estes aspectos são bem limitados (Sakkas *et al.*, 2002; van Wezel & van Vlaardingen, 2004; Voulvoulis, 2006; Gatidou *et al.*, 2007).

O impacto verdadeiro dos novos anti-incrustantes sobre a biota marinha, principalmente em espécies animais, ainda não é bem conhecido. Além disso, são poucos os trabalhos que realizaram estudos comparativos entre o impacto destes compostos e dos COEs. A maioria dos estudos com os novos biocidas se limita a análises químicas, as quais não são suficientes para uma avaliação da qualidade ambiental. Tais análises não indicam, por exemplo, a biodisponibilidade dos contaminantes nem seus efeitos sobre os organismos e/ou ecossistemas. Portanto, é extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos para obter uma avaliação consistente do potencial de periculosidade destas substâncias.

A ausência de dados de toxicidade crônica é uma preocupação particular. É reconhecido que mortalidade, como resposta biológica, não é sensível o suficiente para determinar o risco real de um composto para o ambiente natural. Apesar disso, observa-se pouca atenção dos trabalhos recentes a ensaios que detectem efeitos subletais e de longa duração nas populações. De acordo com Prósperi & Nascimento (2006), tais efeitos podem refletir em diferenciação ou impedimento dos processos reprodutivos e recrutamento de espécies-chave (controlam a abundância e distribuição de muitas outras espécies na comunidade), levando eventualmente a uma sequência de perdas para o ecossistema.

Apesar da extensa literatura sobre os efeitos do TBT e do TPT em organismos marinhos, os dados sobre seus impactos em ambientes brasileiros são escassos. Também não há qualquer registro sobre a avaliação da toxicidade aguda ou crônica para estes compostos, tão pouco para os novos anti-incrustantes, como Irgarol 1051 e Diuron.

As pesquisas relacionadas à toxicidade dos compostos anti-incrustantes permitem que se possa delinear limites seguros quanto ao uso de cada substância, buscando a proteção do meio ambiente sem desprezar a importância econômica intrínseca ao uso desses compostos. Cabe ressaltar que o número de laboratórios que detém a infra-estrutura necessária para a realização de ensaios de toxicidade empregando organismos marinhos nativos, bem como as análises químicas dos microcontaminantes orgânicos, ainda é bastante reduzido no Brasil. Estes motivos provavelmente contribuem para a não existência, em nosso país, de normas com medidas regulatórias em relação aos novos anti-incrustantes.

II. REVISÃO DA LITERATURA

ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

Dentre as várias ciências, uma das que mais se desenvolveu no final do século XX foi a Ecotoxicologia, a qual tem fornecido subsídios para a integração de informações ambientais. Os princípios ecotoxicológicos são baseados na toxicologia humana e fundamentados na capacidade do homem em estimar efeitos deletérios de certas substâncias sobre os organismos vivos.

O termo Ecotoxicologia surgiu em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo, na qual o toxicologista francês René Truhaut definiu a Ecotoxicologia como “a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os seres vivos vivem num contexto integrado” (Truhaut, 1977).

De maneira simplificada, a Ecotoxicologia pode ser apresentada como a integração da toxicologia com a ecologia, ou conforme apresentado por Chapman (2002), a “ecologia na presença de substâncias tóxicas”. Segundo este autor a Ecotoxicologia difere da Toxicologia Ambiental na medida em que integra os efeitos estressores sobre todos os aspectos de organização biológica, desde níveis bioquímicos e moleculares até níveis mais elevados como comunidades e ecossistemas. Em contrapartida, a Toxicologia Ambiental estaria centrada apenas nos efeitos sobre o indivíduo.

Entretanto, nos estudos ecotoxicológicos são utilizados conhecimentos provenientes da toxicologia, ecologia, química, farmacologia, bioquímica, fisiologia, biologia, geologia, estatística, direito, engenharia, e outras ciências, predominando uma abordagem multidisciplinar (Zakrewski, 1991), podendo integrar diferentes informações com base no peso de evidências (Abessa, 2002).

A Ecotoxicologia apresenta como importantes ferramentas os ensaios de toxicidade. Estes ensaios são métodos padronizados, utilizados para avaliar a capacidade inerente de uma dada substância, mistura de substâncias ou amostra ambiental, em causar efeito deletério a organismos vivos. Para que sejam validados, os ensaios são realizados sob condições controladas, onde organismos previamente selecionados são expostos por um determinado período à amostra de interesse, e avaliada a resposta exercida sobre estes.

Nos últimos anos, os ensaios de toxicidade têm ganhado grande atenção e importância por parte da comunidade científica, pois apresentam um significado biológico aos dados químicos e complementam os estudos de contaminação ambiental (Zagatto,

2006b). Estas informações são eficientes instrumentos de avaliação da qualidade de água e/ou sedimento (Nascimento, 2002), e fornecem subsídios para avaliar a eficiência das medidas adotadas que visam à eliminação ou redução dos efeitos no meio ambiente (Prósperi, 2002).

Como todo método de análise de amostras complexas, os ensaios ecotoxicológicos apresentam limitações, principalmente na tentativa de extrapolação de seus resultados para o ambiente natural (Chapman & Long, 1983a). O uso difundido de ensaios com apenas uma espécie é algo que deve ser visto com extrema cautela em avaliações de risco ecológico, visto que a mesma espécie pode ser extremamente sensível a um tipo de contaminante e menos sensível a outro (Fränzle, 2006).

Na literatura internacional são mencionados diversos métodos de ensaios ecotoxicológicos utilizando várias espécies, os quais são aplicados no monitoramento da qualidade de águas continentais, estuarinas e marinhas, (Tabela 1). No Brasil, embora existam registros de estudos ecotoxicológicos datados do final da década de 70, esta ciência se desenvolveu de forma efetiva apenas nos anos 90, com a formação de grupos de pesquisa e a elaboração de novos procedimentos e normas técnicas (Tabela 2). Sua consolidação definitiva se deu em janeiro de 2000 com a fundação da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (Zagatto, 2006b).

Os ensaios ecotoxicológicos em ambientes aquáticos já estão previstos na legislação federal através das resoluções CONAMA 344/2004, que trata da gestão de sedimentos dragados e sua disposição no ambiente (CONAMA, 2004); 357/2005, que discorre sobre as condições e padrões de qualidade de água (CONAMA, 2005); e 393/2007, referente à água produzida proveniente da indústria de petróleo e gás natural em águas jurisdicionais brasileiras (CONAMA, 2007).

Dentre as diversas finalidades de emprego da ecotoxicologia, o presente estudo enfatiza o uso de ensaios de toxicidade aguda e crônica para fins de regulação e a definição de limites máximos permissíveis para o lançamento de substâncias químicas, tais como os anti-incrustantes substitutos aos COEs, e as estimativas do efeito de descargas destes últimos sobre as populações naturais.

Tabela 1: Espécies utilizadas em ensaios ecotoxicológicos normatizadas por entidades internacionais.

EFEITO AVALIADO		ESPÉCIES MARINHAS / ESTUARINAS	ESPÉCIES DE ÁGUA DOCE	REFERÊNCIA
AGUDO	Crustáceos	<i>Mysidopsis bahia</i> *	---	USEPA (2002a), ASTM (1992)
		<i>Ampelisca abdita</i> , <i>Rhepoxynius abronius</i> , <i>Eohaustorius estuarius</i> , <i>E. washingtonianus</i> , <i>Amphiporeia virginiana</i> , <i>Corophium volutator</i> , <i>Foxiphalus xiximeus</i> , <i>Leptocheirus plumulosus</i> e <i>L. pinguis</i>	---	Environment Canada (1998a; 1998b), ASTM (2008d)
		<i>Acartia tonsa</i>	---	ISO (1999)
		---	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Daphnia pulex</i> e <i>D. magna</i>	Environment Canada (1996; 2000b; 2007e), APHA (1998), USEPA (2002a)
		---	<i>Hyalella azteca</i>	ASTM (2000), Envir Canada (1997b)
Moluscos	<i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. virginica</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Mytilus edulis</i>	---	ASTM (2004b)	
	<i>Menidia beryllina</i> , <i>M. menidia</i> , <i>M. peninsulae</i> , <i>Cyprinodon variegatus</i> e <i>Gasterosteus aculeatus</i>	---	USEPA (2002a), Environment Canada (2000a)	
Peixes	---	<i>Salvelinus fontinalis</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Environment Canada (2007a; 2007c), USEPA (2002a)	
	---	<i>Raphidocelis subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Navicula pelliculosa</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i>	ASTM (2004d)	
Algas	<i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (= <i>Selenastrum capricornutum</i>)	Environment Canada (1992)	

CRÔNICO	Crustáceos	<i>Mysidopsis bahia</i> * <i>Americamysis bigelowi</i> , <i>Americamysis almyra</i>	---	USEPA (2002c), ASTM (2008b)
		---	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Daphnia pulex</i> e <i>D. magna</i>	Environment Canada (2007e), USEPA (2002b)
		<i>Amphiascus tenuiremis</i>	---	ASTM (2004a)
	Poliquetos	<i>Neanthes arenaceodentata</i> , <i>Capitella capitata</i> , <i>Ophryotrocha diadema</i> , <i>Dinophilus gyrociliatus</i>	---	ASTM (2006)
		<i>Polydora cornuta</i>	---	Environment Canada (2001)
Equinodermos	<i>Arbacia punctulata</i> , <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> , <i>S. droebachiensis</i> , <i>Dendraster excentricus</i> , <i>Lytechinus pictus</i>	---	USEPA (2002c), ASTM (2004c), Environment Canada (1997a)	
	<i>Cyprinodon variegatus</i> , <i>Menidia beryllina</i>	---	USEPA (2002c)	
Peixes	---	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>O. kisutch</i>	USEPA (2002b), Environment Canada (1998c)	
	<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	---	ISO (1995)	
Algas	---	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (= <i>Selenastrum capricornutum</i>)	APHA (1998), USEPA (2002b), Environment Canada (1992; 2007b)	
	---	<i>Lemna minor</i>	Environment Canada (2007d)	

* O gênero deste organismo foi oficialmente alterado para *Americamysis* (Price *et al.*, 1994); no entanto os referidos manuais continuam a utilizar *Mysidopsis bahia* para manter a consistência com as versões anteriores dos métodos.

Tabela 2: Espécies utilizadas em ensaios ecotoxicológicos normatizadas por órgãos nacionais.

EFEITO AVALIADO		ESPÉCIES MARINHAS / ESTUARINAS	ESPÉCIES DE ÁGUA DOCE	REFERÊNCIA
AGUDO	Crustáceos	<i>Mysidopsis juniae</i> <i>Mysidium gracile</i> --- ---	--- --- <i>Daphnia</i> spp. <i>D. similis</i>	CETESB (1992), ABNT (2005a) ABNT (2004) CETESB (1991b),
	Peixe	---	<i>Danio rerio</i>	CETESB (1990a; 1990b)
	Alga	---	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (= <i>Selenastrum capricornutum</i>)	CETESB (1989)
CRÔNICO	Crustáceos	--- ---	<i>Ceriodaphnia</i> spp. <i>Ceriodaphnia dubia</i>	ABNT (2005b) CETESB (1991a)
	Bactérias	<i>Vibrio fisheri</i> <i>Spirillum volutans</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i>	---	CETESB (2001)
	Equinodermos	<i>Lytechinus variegatus</i> <i>Echinometra lucunter</i>	--- ---	CETESB (1999), ABNT (2006)
	Alga	---	<i>Chlorophyceae</i> spp	ABNT (2005c)

INCRUSTAÇÃO MARINHA

Os organismos incrustantes são caracterizados por viverem aderidos a um substrato consolidado durante a maior parte do seu ciclo de vida. Uma vez submersa no ambiente aquático, qualquer estrutura pode ser utilizada como substrato para o assentamento e o desenvolvimento desses organismos. A bioincrustação ocorre de maneira progressiva, seguindo o processo de sucessão ecológica, o qual se inicia pela formação de um biofilme de bactérias, seguidos pelo assentamento de algas efêmeras, algas perenes e espécies animais (Molino & Wetherbee, 2008; Molino *et al.*, 2009).

Uma vez colonizadas, estruturas fixas tais como plataformas e tubulações ou estruturas flutuantes, como bóias de deriva e embarcações, sofrem uma aceleração do processo de corrosão. Além disso, pode ocorrer entupimento de orifícios ou tubulações, problemas estruturais devido ao aumento da massa ou deformação da configuração original e alteração das condições hidrodinâmicas (Molino & Wetherbee, 2008).

Quando aderidas em estruturas móveis, como navios, os quais têm grande deslocamento global, estas espécies podem ser transportadas para regiões diferentes de sua

área natural. Assim, através da liberação de larvas ou propágulos, podem ser introduzidas espécies exóticas (bioinvasão). Espécies invasoras podem causar danos às espécies nativas por exclusão competitiva, introdução de doenças ou predação (Silva & Souza, 2005). Neste aspecto, o desenvolvimento das práticas anti-incrustantes tiveram certa contribuição na prevenção da bioinvasão através dos oceanos do mundo (Evans *et al.*, 2000a).

No entanto, o principal aspecto que levou ao progressivo desenvolvimento de tintas anti-incrustantes, é o aumento da rugosidade ocasionado por estes organismos nos cascos das embarcações. O aumento da rugosidade acarreta na maior fricção com a água durante o deslocamento das embarcações, proporcionando um considerável aumento no consumo de combustível. Uma camada de organismos com 1 mm de espessura poderá aumentar a fricção do casco com a água em 80%, o que leva a uma diminuição de 15% na velocidade do navio, e ao aumento no consumo de combustível em até 17% (Evans *et al.*, 2000a). Estes dados são economicamente alarmantes, tendo em vista que o combustível representa aproximadamente metade dos custos do transporte marítimo (Champ, 2000).

DESENVOLVIMENTO DAS TINTAS ANTI-INCrustANTES E SUAS IMPLICAÇÕES AMBIENTAIS

Desde o início das navegações marítimas, o homem sentiu necessidade de proteger os cascos de suas embarcações das incrustações marinhas. Existem registros de que os povos da antiguidade como os Fenícios e os Cartagineses já utilizavam peças de cobre com o objetivo de prevenir bioincrustações. Esta técnica foi também utilizada pelos Gregos e Romanos no século III, que teriam também utilizado peças de chumbo fixadas com pregos de cobre e recobertos por betume (Callow, 1990).

No século XVII eram utilizados cascos de madeira cobertos com misturas de alcatrão, gorduras e piche (Young, 1867). Na mesma época também surgiram outros tipos de revestimentos como borracha, ebonite e cortiça, os quais por serem muito caros e/ou de difícil aplicação, acabaram por ser descartados para tal finalidade (Yebra *et al.*, 2004).

Em meados do século XVIII surgiram as primeiras formulações anti-incrustantes contendo compostos biocidas à base de cobre, arsênio ou óxido de mercúrio. Estes biocidas eram dispersos em óleo de linhaça, vernizes ou resinas naturais, baseadas na idéia de dispersar um tóxico poderoso em um ligante polimérico (Young, 1867; Almeida *et al.*, 2007). Por fim, no final deste século as propriedades anti-incrustantes do cobre ganharam tamanha proeminência que o material passou a substituir definitivamente outros sistemas que eram utilizados até então (Callow, 1990).

Na primeira metade do século XX, o desenvolvimento da química polimérica levou ao surgimento de resinas sintéticas que mais tarde foram aplicadas às tintas e houve o aprimoramento das tecnologias que facilitaram sua aplicação. Inúmeras substâncias como compostos de mercúrio, arsênico e o DDT foram utilizadas até o início de 1960. Nessa

época as tintas contendo óxido de cobre ainda eram as mais utilizadas, porém começaram a ser observados os primeiros efeitos danosos ao ambiente, além de sua eficiência ser inferior a 1 ano (Almeida *et al.*, 2007). Dessa forma, havia necessidade de se desenvolver sistemas anti-incrustantes mais efetivos.

Por volta de 1950 surgiram as primeiras tintas organometálicas, e como consequência de um estudo sistemático, foram desenvolvidos os anti-incrustantes à base de estanho. As propriedades biocidas dos compostos triarilestânicos e triarilestânicos foram, então, descobertas e passaram a ser exploradas comercialmente (Luijten, 1987). Em função da sua eficiência, as tintas a base de tributilestanho (TBT) e, mais tarde, de trifenilestanho (TPT) se tornaram populares (Omae, 2003; Omae, 2006).

As primeiras tintas anti-incrustantes à base de COEs continham óxido de bis-tributilestanho ou haletos de tributilestanho simplesmente misturados às tintas. Estas eram as denominadas tintas de livre-associação, cuja liberação do composto ocorria através do atrito da camada superficial da tinta com a água. A taxa de liberação do biocida diminuía exponencialmente até que não houvesse composto disponível para ser liberado. Este processo ocorria em torno de 15 meses (Almeida *et al.* 2007). Além disso, o carbonato de cálcio presente no ambiente obstruía os micro-canais na superfície do filme “envelhecido”, comprometendo ainda mais a ação anti-incrustante (Champ & Lowenstein, 1987; Huggett *et al.*, 1992).

Na década de 1970 foi desenvolvido um sistema mais efetivo, onde monômeros de TBT eram incorporados a outros monômeros para formar copolímeros, tais como metacrilato de tributilestanho (Huggett *et al.*, 1992). Estas receberam a denominação de tintas anti-incrustantes em copolímeros, onde o composto de organoestanho permanece quimicamente ligado à matriz da tinta. Esta ligação é rompida apenas na presença de água sob condições levemente básicas, igual à encontrada na água do mar (pH > 8). Dessa forma, a liberação de TBT ocorre durante o movimento da água sobre a superfície da camada de tinta, a qual é lentamente polida, motivo pelo qual estas tintas também são conhecidas como “tintas anti-incrustantes de auto-polimento” (Almeida *et al.*, 2007).

Neste sistema, o desgaste da superfície da tinta expõe constantemente novas camadas do copolímero, o que permite a liberação do biocida a uma taxa mais lenta e constante. Assim, a ação anti-incrustante da tinta é muito mais estável e duradoura, possibilitando intervalos de docagem entre 5-7 anos para re-aplicação da tinta nas embarcações. Além disso, as tintas em copolímeros podiam ser aplicadas no casco do navio sem a necessidade de remover a camada anterior, o que diminuía os custos de manutenção (Champ & Lowenstein, 1987).

O extenso uso das tintas a base de COEs, principalmente nas tintas de livre associação, resultou em elevados níveis ambientais. Estes compostos, mesmo em baixas

concentrações, apresentam alta toxicidade à biota, inclusive a organismos não-alvo (Alzieu *et al.*, 1986; Alzieu, 1998; Alzieu, 2000a; Alzieu, 2000b; Lee *et al.*, 2005). Além dos efeitos deletérios na biota marinha, o que mais alarmou a comunidade científica foi o fato deste composto (TBT) ser acumulado através dos diferentes níveis tróficos e, conseqüentemente, sua detecção em organismos marinhos componentes da dieta humana (Sekizawa *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Galloway, 2006; Cao *et al.*, 2009).

Dentre os danos ambientais ocasionados pelos COEs, o primeiro a ser descrito foi um tipo de anomalia observado nas conchas de ostras, denominado “*balling*”, que consiste na formação de septos entre as camadas de carbonato de cálcio (Alzieu *et al.*, 1986; Tsu-Chang *et al.*, 1998). Na França, por exemplo, cultivos situados próximos a áreas portuárias apresentaram declínio populacional e estas deformidades tornaram as ostras comercialmente inviáveis, acarretando no colapso dessa atividade no início da década de 1980 (Alzieu, 2000a).

A presença de COEs em tecidos de diversas espécies de mexilhões já foi reportada em diferentes regiões do mundo; como exemplo podem ser citados os trabalhos realizados no mar Báltico (Albalat *et al.*, 2002); na Península Ibérica (Cajaraville *et al.*, 2000); em áreas costeiras do Japão (Harino *et al.*, 1999) na Nova Zelândia (Hayward *et al.*, 1997); na Coreia do Sul (Hong *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008); no Mar do Norte (Mensink *et al.*, 1997); no Mar Mediterrâneo (Morcillo & Porte, 1997); na costa Leste (Roper *et al.*, 2001) e na costa Oeste dos EUA (Stephenson *et al.*, 1986); na costa Oeste da Islândia (Skarphedinsdottir *et al.*, 1996); no Estuário do Rio Tyne, Inglaterra (Smith *et al.*, 2006); no golfo de Saint Lawrence, Canadá (St-Jean *et al.*, 1999); na Indonésia (Sudaryanto *et al.*, 2000); na Malásia (Sudaryanto *et al.*, 2004); na Tailândia (Kan-Atireklap *et al.*, 1997); Golfo de Bengala, Índia (Kan-Atireklap *et al.*, 1998); nas Filipinas (Prudente *et al.*, 1999); no Lago Ontário, Canadá (Yang *et al.*, 2001) (água doce); e na Costa Oeste da Austrália (Burt & Ebell, 1995).

Contudo, o efeito mais conhecido ocasionado pela contaminação por COEs, é a disfunção endócrina em gastrópodes marinhos denominada imposex. Os compostos organoestânicos inibem a atividade do complexo multi-enzimático citocromo P-450, responsável pela conversão da testosterona em estradiol 17β . Esta inibição hormonal acarreta em um acúmulo de hormônio masculinizante, e o conseqüente, desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de gastrópodes, como o surgimento de pênis e vaso deferente. Este fenômeno é irreversível e pode ocasionar a extinção local de populações de espécies com desenvolvimento direto (Ronis & Mason, 1996; De Mora & Pelletier, 1997; Morcillo *et al.*, 1998; Oberdorster *et al.*, 1998). Devido a alta toxicidade dos compostos anti-incrustantes à base de estanho (COEs), vários países restringiram o seu uso, o que levou ao desenvolvimento de novos sistemas anti-incrustantes. A pressão

passou a ser ainda maior quando foi proposto o banimento mundial destes anti-incrustantes pela IMO (ver seção 2.4.).

Dentre os compostos que têm sido utilizados como substitutos aos COEs nas tintas anti-incrustantes, os que tem ganhado espaço nos mercados mundiais são: clorotalonil, diclorofluanida, diuron, irgarol 1051, sea-nine 211, TCMS piridina, TCMTB, zinco-piritiona e zineb. Estes compostos podem estar presentes em tintas associadas com metais, como o cobre e zinco (Thomas *et al.*, 2000). Várias espécies de algas mostraram tolerância ao cobre e, sendo estes organismos responsáveis pela colonização primária na sucessão ecológica no processo de incrustação, substâncias herbicidas passaram a ser adicionados às formulações das tintas (Voulvoulis *et al.*, 1999). Além disso, outros compostos sintéticos também estão sendo utilizados em associação ao cobre como aditivos para conferir um melhor efeito biocida sobre uma gama maior de espécies marinhas, mas também tem sua origem em praguicidas utilizados na agricultura (Evans *et al.*, 2000a).

Após os COEs, o composto Irgarol 1051 foi o primeiro biocida a ganhar destaque devido aos problemas ambientais associados ao seu uso. Este composto é um potente inibidor do fotossistema II (Devilla *et al.*, 2005a; Devilla *et al.*, 2005b) sendo, portanto, altamente tóxico para plantas aquáticas. Entretanto, este composto apresenta baixa toxicidade para a maioria das classes de animais (Moreland, 1980). Por isso, é invariavelmente combinado ao cobre para promover uma ação anti-incrustante eficiente também contra animais.

Contaminação ambiental por Irgarol oriundo de tintas anti-incrustantes foi reportada na Europa e EUA (Thomas & Langford, 2009), e em diversos países da Ásia (Harino *et al.*, 2009). Em um único estudo realizado no Brasil, Azevedo *et al.* (2004) determinaram a concentração de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ de Irgarol 1051 em uma área de atividade de barcos de pequeno porte no rio Paraíba do Sul (município de Campos de Goytacazes, RJ). Em se tratando de ambientes marinho e estuarino do Brasil, ainda não existe registro na literatura sobre a presença deste composto.

Outro biocida que recentemente passou a ser utilizado como anti-incrustante é o Diuron. Este composto é um herbicida com ampla utilização mundial, e já vinha sendo utilizado há décadas na agricultura (Evans *et al.*, 2000a). De maneira similar ao Irgarol 1051, o mecanismo de ação se dá através da inibição do fotossistema II dos organismos fotossintetizantes (Giacomazzi & Cochet, 2004).

As concentrações relativamente altas de Diuron em águas costeiras foram primariamente devido ao seu uso na agricultura (Voulvoulis *et al.*, 1999). Todavia, vários estudos relacionaram a presença deste composto e seus subprodutos de degradação em águas superficiais e sedimentos ao seu uso em tintas anti-incrustantes, uma vez que os níveis encontrados foram relativamente altos em áreas com intenso tráfego de embarcações,

particularmente em marinas e portos (Dahl & Blanck, 1996; Boxall *et al.*, 2000; Voulvoulis *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2003; Giacomazzi & Cochet, 2004). No Brasil não há registro de contaminação ambiental por Diuron relacionada exclusivamente ao seu uso como agente anti-incrustante, no entanto na literatura nacional são encontrados diversos estudos relativos ao uso deste composto na agricultura (Luchini, 1987; Musumeci *et al.*, 1995; Rocha, 2003).

Como estes novos anti-incrustantes também apresentam características biocidas relativamente altas, a avaliação dos seus níveis e efeitos no ambiente aquático têm sido de crescente importância nos últimos anos (Voulvoulis *et al.*, 1999; Konstantinou & Albanis, 2004). Além disso, recentemente estudos têm apontado riscos ambientais associado ao uso destes compostos, tanto para os organismos aquáticos quanto para a saúde humana (Champ, 2000; Cao *et al.*, 2009; Mochida & Fujii, 2009b).

Os problemas ambientais proporcionados, tanto pelo Diuron quanto pelo Irgarol 1051, residem no fato de apresentarem alta persistência no ambiente, os quais podem variar de um mês a um ano (Okamura *et al.*, 2003). No entanto, são poucos os dados quanto a sua biodegradação *in situ*. Em laboratório, a degradação do Diuron foi observada após 42 dias em água do mar a 15°C e seus produtos de degradação se mostraram pouco persistentes (Thomas *et al.*, 2001). A matéria orgânica no sedimento influencia diretamente a adsorção de Diuron que, segundo Giacomazzi & Cochet (2004), pode ser de difícil reversão, o que sugere que estes compostos podem não ser disponibilizados para o ambiente aquático.

ASPECTOS LEGAIS ENVOLVENDO OS ANTI-INCRUSTANTES

As primeiras ações regulatórias e legislativas de gerenciamento de riscos para os COEs foram adotadas na França em 1982, em razão do impacto do TBT sobre a espécie de ostra *Crassostrea gigas* comercialmente cultivada na baía de Arcachon (Alzieu, 2000a). Naquela época vários estudos foram realizados relacionados à persistência ambiental e destino dos COEs em ecossistemas aquáticos e ficou evidente que a ação biocida dos compostos anti-incrustantes afetavam espécies não-alvo (Stringer *et al.*, 2000).

Legislações para restringir o uso de TBT foram implementadas, subseqüentemente, em muitos países ao redor do mundo, inclusive em alguns sem ligação direta com o mar, como Áustria e Suíça. Estes países proibiram o TBT em seus lagos e rios, declarando que, dessa forma, poderiam impedir os efeitos diretos nas comunidades de água doce e minimizar os impactos indiretos nos habitats marinhos (Becker Van-Slooten & Tarradellas, 1994; Fent, 1996b).

Em novembro de 1999, durante a 21^a Assembléia da Organização Marítima Internacional (IMO), foi discutido a necessidade urgente de se elaborar um documento legal, em escala mundial, com o intuito de minimizar os efeitos prejudiciais proporcionados pelos sistemas anti-incrustantes. De tal modo que, em 2001 na cidade da Londres, Inglaterra, foi

promovida por esta instituição a Convenção dos Sistemas Anti-incrustantes (*Antifouling Systems Convention*). Esta convenção estabeleceu a proibição da aplicação de tintas à base de TBT em quaisquer embarcações a partir de 1º de janeiro de 2003. As embarcações que haviam sido pintadas antes desta data poderiam permanecer com seu revestimento até a data limite de 1º de janeiro de 2008, quando não seria mais permitida a presença de COEs e seus subprodutos em tintas anti-incrustantes (IMO, 2008). A Tabela 3 apresenta as principais diretrizes adotadas pelos países com relação ao uso de COEs ao longo dos anos.

Com relação aos novos anti-incrustantes, em 1998 o Reino Unido já havia adotado restrições para alguns deles, proibindo a utilização de tintas com os compostos diclofluanido, zinco-piritiona ou zineb, nas embarcações com menos de 25 metros de comprimento (Thomas *et al.*, 2001). Essa restrição se estendeu ao Irgarol 1051 em 2001, sendo que as tintas contendo este composto foram totalmente retiradas do mercado para uso em pequenas embarcações (Cresswell *et al.*, 2006).

Na Holanda, foi proposto pelo *Dutch National Institute of Public and the Environment* o valor de 24 ng L⁻¹ como concentração máxima de Irgarol 1051 permitida em suas tintas. Em 2001, tintas à base de cobre e de Irgarol 1051 foram proibidas na costa leste da Suécia (Karlsson & Eklund, 2004), e o Diuron só pôde ser utilizado em embarcações maiores de 25 metros de comprimento (Thomas *et al.*, 2001). Na mesma época, as restrições aos novos biocidas também foram impostas na Dinamarca, onde o Irgarol 1051 e o Diuron são permitidos apenas em embarcações maiores que 25 metros de comprimento.

No Brasil, segundo a Resolução CONAMA 357/2005, as concentrações máximas de TBT permitidas são de 0,01 µg L⁻¹ para águas salinas e salobras de classe 1, e 0,37 µg L⁻¹ para águas salinas e salobras de classe 2 (CONAMA, 2005). Recentemente, em 1º de novembro de 2007, entrou em vigor no Brasil a NORMAM-23/DPC (Marinha do Brasil, 2007) proibindo definitivamente uso de tintas anti-incrustantes contendo COEs. Este documento atribuiu, também, normas e procedimentos específicos das ações, como fiscalização e registro de todos os sistemas anti-incrustantes. Além disso, prevê a certificação de empresas fabricantes e importadoras de produtos anti-incrustantes e o gerenciamento de resíduos destes compostos.

A preocupação das autoridades brasileiras em relação às concentrações de TBT em suas águas jurisdicionais representa um avanço, uma vez que as leis brasileiras não contemplavam esse composto e os seus impactos. Além disso, acredita-se na necessidade de que sejam realizados estudos mais detalhados em território nacional para definir valores mais condizentes com nossa realidade, visto que concentrações na ordem de 1 ng L⁻¹ são suficientes para induzir impacto sobre populações de organismos marinhos (Alzieu, 2000b).

Tabela 3: Cronologia resumida das principais restrições relativas ao uso de COEs no mundo (modificado de IMO, 2000b; e Walmsley, 2002).

País	Ano	Regulamentação
França	1982	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m de comprimento, com exceção de embarcações com casco de alumínio.
Reino Unido	1985 1987	Venda de tintas a base de TBT restrita, exclusão efetiva de tintas com TBTO em livre associação. Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m e em equipamentos utilizados em aquicultura. Tintas anti-incrustantes a base de TBT disponíveis apenas em recipientes de 20 litros. Registro de todos os anti-incrustantes como pesticidas. Venda e uso de anti-incrustantes apenas mediante aprovação do Comitê Consultivo de Praguicidas. Resíduos tratados como materiais perigosos.
Suíça	1987	Proibição do uso de tintas anti-incrustantes com TBT em lagos de água doce. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Áustria	1988	Proibição do uso de tintas anti-incrustantes com TBT em lagos de água doce.
Estados Unidos	1988 1990	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m de comprimento, com exceção de embarcações com casco de alumínio. Taxa de lixiviação máxima de 4 µg/cm ² /dia em embarcações menores que 25 m. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados. Tintas a base de TBT utilizadas apenas por aplicadores certificados.
Austrália	1989	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m. Taxa de liberação máxima de 5 µg por centímetro quadrado por dia (µg/cm ² /dia) para embarcações maiores que 25 m. Todas as docas devem ser registradas junto a Agência de Proteção do Ambiental devido as descargas. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Canadá	1989	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m, com exceção de embarcações com casco de alumínio. Taxa de lixiviação máxima de 4µg/cm ² /dia em embarcações menores que 25 m. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Nova Zelândia	1989	A aplicação de tintas com TBT copolímero foi proibida com três exceções: cascos de alumínio, <i>outdrive</i> de alumínio, ou qualquer embarcação maior que 25 m. Proibição da aplicação de TBTO (óxido de tibutilestanho) de livre-associação. Taxa de lixiviação máxima de 5 µ g/cm ² /dia para embarcações maiores que 25 m. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Noruega	1989	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m de comprimento.
Suécia	1989 1992	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m de comprimento. Taxa de lixiviação máxima de 4 µg/cm ² /dia em embarcações menores que 25 m de comprimento. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Alemanha	1990	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m. Proibida a venda no varejo. Proibição do uso em estruturas para maricultura. Regulamentos para a disposição segura de coberturas anti-incrustantes depois da remoção.
Países Baixos	1990	Taxa de lixiviação máxima de 4 µg/cm ² /dia em embarcações menores que 25 m de comprimento. Materiais utilizados e resíduos provenientes da preparação de tintas anti-incrustantes contendo TBT devem ser tratados como resíduos perigosos. Tintas anti-incrustantes a base de TBT disponíveis apenas em recipientes de 20 litros.
Japão	1990 1992	Proibição do uso de TBT em todas as embarcações novas. TBT banido em todas as embarcações.
Comissão da Comunidade Européia (C.E.)	1991	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m. Tintas anti-incrustantes a base de TBT disponíveis apenas em recipientes de 20 litros.
Não membros da C.E.		Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m de comprimento (a maioria dos países).
Finlândia	1991	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m de comprimento.
África do Sul	1991	Proibição do uso de tintas a base de TBT em embarcações menores que 25 m. Tintas anti-incrustantes a base de TBT disponíveis apenas em recipientes de 20 litros. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Hong Kong	1992	Todos os anti-incrustantes com TBT devem ter uma licença válida para importação/fornecimento. Todos os anti-incrustantes devem ser registrados.
Brasil	2005 2007	Resolução CONAMA 357/2005, as concentrações máximas de TBT permitidas são de 0,01 µg L ⁻¹ para águas salinas de classe 1 e 0,37 µg L ⁻¹ para águas salinas de classe 2. Proibição definitiva de tintas anti-incrustantes contendo COEs. Registro de todos os sistemas anti-incrustantes. Certificação das empresas importadoras e fabricantes destes produtos e gerenciamento dos resíduos.
Proibição Mundial (IMO)	2003 2008	Banimento global– não permitida a reaplicação de camadas de TBT. 1º de Janeiro de 2008, proibição do TBT em qualquer navio ou estruturas.

III. COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTUDO

COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS – TRIBUTILESTANHO (TBT) E TRIFENILESTANHO (TPT)

Os primeiros compostos organoestânicos (COEs) produzidos no mundo foram o diiodeto de dietilestanho em 1853, seguido pelo tetraetilestanho em 1859. No entanto, a primeira aplicação prática dos compostos organoestânicos foi apresentada em meados de 1925, quando estes compostos eram utilizados como estabilizantes do cloreto de polivinila (PVC). No entanto, foi por volta de 1940 que estes compostos ganharam grande destaque com a produção em larga escala deste polímero (Yngve, 1940; Omae, 2003).

Os COEs apresentam a fórmula geral $R_n\text{Sn}X_{4-n}$ e são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações entre o átomo de estanho e o átomo de carbono. Nesta fórmula, R é um radical alquil ou aril, X é uma espécie aniônica, como cloreto, óxido, hidróxido ou outro grupo funcional, sendo que n pode variar entre 1 a 4 (Blunden *et al.*, 1991). O uso destes compostos como biocida teve início na década de 1950, sendo principalmente utilizados como componente ativo de tintas de ação anti-incrustante. Além disso, seu emprego em pesticidas, principalmente acaricidas e fungicidas, tornou-se comum na década de 1970 (Almeida *et al.*, 2007).

Os compostos tetraorganoestânicos ($R_4\text{Sn}$) não possuem atividade biológica significativa e sua maior aplicação comercial é como precursor para outros compostos organoestânicos. A atividade biológica máxima ocorre em compostos triorganoestânicos, os quais apresentaram importância comercial como biocidas. Os principais COEs são Tributilestanho e o Trifenilestanho, sendo este último, além da presença em tintas anti-incrustante, largamente utilizado como fungicida (Piver, 1973).

Os compostos dialquilestânicos, principalmente aqueles contendo ligações entre estanho e enxofre, são poderosos estabilizantes para o PVC e conferem ao polímero maior resistência à luz e ao calor (Blunden *et al.*, 1991). Já os compostos monoorganoestânicos apresentam baixa toxicidade e existem indicações de que possam ser utilizados como agentes à prova d'água para materiais celulósicos, como algodão têxtil, papel e madeira, e como retardantes de fogo para tecidos de lã (Piver, 1973; Blunden *et al.*, 1991).

O processo de degradação dos COEs ocorre através de progressiva redução dos radicais R (conforme a fórmula geral apresentada acima). Dessa forma, em compostos triorganoestânicos, como TBT e TPT, ocorre a progressiva desbutilação/desfenilação (Figura 1), passando de tri(butil/felil)estanho a di(butil/felil)estanho, em seguida a mono(butil/felil)estanho e, por fim, à estanho inorgânico. Diversos fatores abióticos, como a radiação UV, radiação gama e temperatura, além de fatores bióticos como a biodegradação bacteriana, são responsáveis por essa transformação, dando origem a compostos

progressivamente mais simples e menos tóxicos (Clark *et al.*, 1988). As propriedades físico-químicas do TBT e do TPT estão apresentadas na tabela 4.

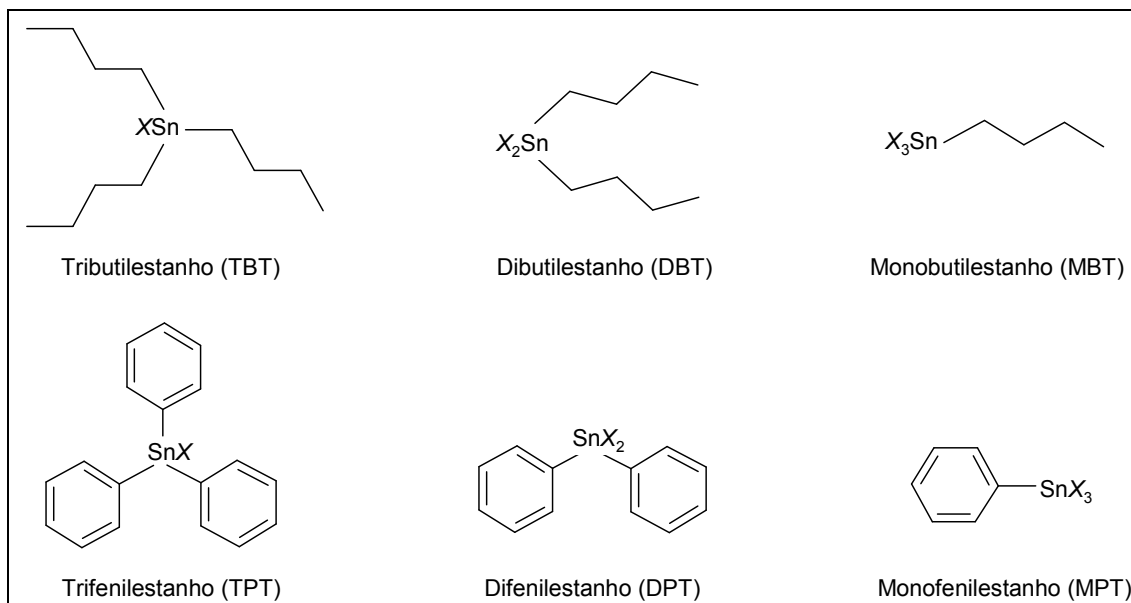


Figura 1: Tributilestanho e Trifenilestanho e seus respectivos produtos de desbutilação e desfenilação. X=espécie aniônica (ex: cloreto, óxido, hidróxido).

IRGAROL 1051

O Irgarol 1051 (2 metiltio-4-tert-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) é um biocida pertencente ao grupo químico das triazinas (Figura 2). Este composto apresenta ação herbicida, a qual está baseada na inibição do fotossistema-II, onde impede produção de oxigênio dentro da célula de organismos fotossintetizantes, mais precisamente na cadeia transportadora de elétrons (Giacomazzi & Cochet, 2004). As propriedades físico-químicas do Irgarol estão apresentadas na tabela 4.

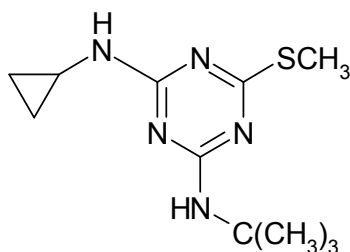


Figura 2: Fórmula estrutural do Irgarol 1051

O Irgarol 1051 tem sido utilizado como agente anti-incrustante na Europa desde a década de 80, porém seu uso nas Américas foi registrado apenas em 1998 (Voulvoulis, 2006). Os primeiros registros deste composto no ambiente marinho foram feitos para águas superficiais de marinas da Côte d'Azur (França), com concentrações acima de 1,7 ng L⁻¹

(Readman *et al.*, 1993). Desde então, são inúmeros os trabalhos onde o Irgarol 1051 tem sido relatado como um contaminante do ambiente aquático (Konstantinou & Albanis, 2004).

Sakkas *et al.* (2002) confirmaram que o Irgarol 1051, em água do mar, pode ser degradado através de irradiação solar (meia-vida de 59 dias) e que a taxa de fotodegradação aumenta na presença de matéria orgânica dissolvida, como substância húmicas e fúlvicas. Segundo Okamura *et al.* (2003), o Irgarol 1051 pode ser degradado sob ação do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e, de acordo com Liu *et al.* (1997), a principal rota de metabolismo do Irgarol 1051 por este fungo inclui a *n*-desalquilação de um grupo ciclopropil na cadeia do ciclopropilamino, na posição seis do anel s-triazina, gerando o metabolito M1.

Três metabólitos resultantes de sua degradação foram identificados até o momento, sendo designados como M1, M2 e M3 (Lam *et al.*, 2005). Contudo, são escassos os estudos sobre a toxicidade destes três metabólitos, pois pouco se conhece quanto a seu comportamento no ambiente natural. Embora Irgarol 1051 possa ser levemente degradado por microorganismos ou luz solar, foi comprovada a persistência deste biocida no ambiente aquático (Harino & Langston, 2009).

DIURON

O Diuron (3-[3,4-diclorofenil]-1,1-dimetiluréia) (Figura 3) é um composto não iônico com moderada solubilidade em água, estável à oxidação e à quebra. Sua taxa de hidrólise é insignificante em um pH neutro, porém, esta taxa aumenta em condições fortemente ácidas ou alcalinas. Este composto é um herbicida do grupo das uréias substituídas e seu mecanismo de ação é a inibição do fotossistema II e conseqüente interrupção da fotossíntese (Wessels & Vanderveen, 1956). Por este motivo, o Diuron é utilizado na agricultura desde 1950 (Yebra *et al.*, 2004). As propriedades físico-químicas do Diuron estão apresentadas na tabela 4.

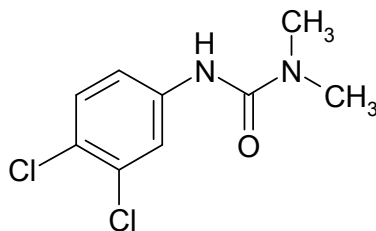


Figura 3: Fórmula estrutural do Diuron

Este composto tem alta persistência no ambiente (meia vida até 6 meses), podendo ser encontrado em sedimento ou coluna d'água (Okamura *et al.*, 2003). Em laboratório, a degradação do Diuron foi observada após 42 dias em água do mar a 15°C e seus produtos

de degradação se mostraram pouco persistentes (Thomas *et al.*, 2001). Apesar de ser considerado um composto muito persistente na água do mar, a sua principal forma de degradação parece ser a biodegradação por bactérias (Harino *et al.*, 2005; Harino & Langston, 2009). Harino *et al.* (2005) reportaram que mudanças nas concentrações de Diuron foram relativamente pequenas durante 17 dias de irradiação de luz solar.

Em condições aeróbicas a biodegradação do Diuron resultou na formação dos metabólitos 1-(3,4-diclorofenil)-3-metiluréia (conhecido como DCMPU) e 1-(3,4-diclorofenil)uréia (DCPU). Já em condições anaeróbicas, como em sedimento, resultou na formação do 1-(3-clorofenil)-3,1-dimetiluréia (CPDU) (Giacomazzi & Cochet, 2004). Entretanto, apesar de alguns estudos apontarem a degradação do Diuron via microorganismos, nos últimos anos têm sido reportadas concentrações relativamente altas deste composto no ambiente aquático (Harino & Langston, 2009).

Tabela 4: Informações gerais e propriedades físico-químicas dos compostos selecionados para estudo.

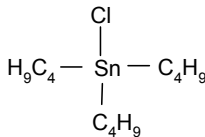
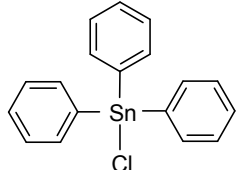
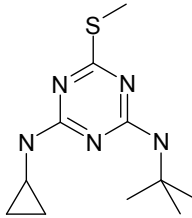
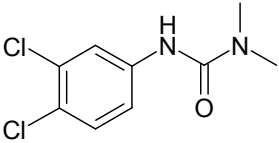
TBT	
(C ₄ H ₉) ₃ SnCl	
Nº CAS: 1461-22-9	
Propriedade	Valor
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	16
Log K _{ow}	3,54
Log K _{oc} (mL g ⁻¹)	5,7
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	7,6 10 ⁻²
Pressão de vapor (Pa)	9,3 10 ⁻³
TPT	
(C ₆ H ₅) ₃ SnCl	
Nº CAS: 639-58-7	
Propriedade	Valor
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	5,2
Log K _{ow}	4,1
Log K _{oc} (mL g ⁻¹)	5,7
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	5,2
Pressão de vapor (Pa)	4,1

Tabela 4 (cont.): Informações gerais e propriedades físico-químicas dos compostos selecionados para estudo

Irgarol 1051	
2-Metiltio-4-tert-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina	
Nº CAS: 28159-98-0	
Propriedade	Valor
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	7
Log <i>Kow</i>	4,1
Log <i>Koc</i> (mL g ⁻¹)	2,38
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	5,4 x10 ⁻⁶
Pressão de vapor (Pa)	1,5 x10 ⁻⁴
Diuron	
3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea	
Nº CAS: 330-54-1	
Propriedade	Valor
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	36,4
Log <i>Kow</i>	2,85
Log <i>Koc</i> (mL g ⁻¹)	2,7
Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	5,1 x10 ⁻⁵
Pressão de vapor (Pa)	4,1 x10 ⁻³

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto de compostos utilizados em tintas anti-incrustantes, através de ensaios ecotoxicológicos com espécies marinhas e estuarinas nativas da costa do Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos tóxicos dos compostos TBT, TPT, Irgarol 1051 e Diuron, através de ensaios de toxicidade aguda utilizando o copépodo *Acartia tonsa*, o misídeo *Mysidopsis juniae*, o tanaidáceo *Kalliapseudes schubartii* (Capítulo 1);
2. Avaliar os efeitos sub-letais destes compostos, através de ensaios de toxicidade crônica com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Capítulo 2);
3. Avaliar a toxicidade destes compostos em sedimento, através de ensaios de toxicidade aguda com o anfípodo escavador *Tiburonella viscana* (Capítulo 3).
4. Fornecer subsídios para inclusão ou refinamento dos limites de concentrações ambientais seguras dos compostos anti-incrustantes na legislação ambiental brasileira.

CAPÍTULO 1

AValiação da Toxicidade Aguda em Matrizes Aquosas

1.1 INTRODUÇÃO

O ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos (geralmente letalidade), sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo em relação ao seu ciclo de vida. Devido à facilidade de execução, curta duração e baixos custos os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (Birge *et al.*, 1985).

A avaliação de substâncias químicas isoladas através da determinação da CL50 (concentração letal para 50% dos indivíduos da população estudada) permite predeterminar níveis “seguros” e a definição de limites máximos permissíveis para a liberação total ou residual de tais substâncias no ambiente. Além disso, é uma ferramenta que possibilita avaliar a toxicidade conjuntamente com outros compostos ou associados a parâmetros físico-químicos. Adicionalmente, os ensaios agudos podem ser aplicados para monitoramento de qualidade e diagnóstico dos corpos receptores (Bertoletti, 1990).

Devido à crescente preocupação em salvaguardar os ambientes marinhos e estuarinos, é cada vez maior o número de espécies de microcrustáceos marinhos utilizadas em ensaios de toxicidade aguda. Entretanto, existe uma carência de testes padronizados para espécies de águas salinas (Nipper & Prósperi, 1993; Aragão & Araújo, 2006). Provavelmente este seja o motivo pelo qual a disponibilidade de informações acerca da toxicidade aguda de compostos químicos sobre espécies marinhas e estuarinas sejam limitadas quando comparadas com espécies de água doce.

Na literatura científica, a maioria dos estudos em que foi avaliada toxicidade de misturas preparadas em laboratório foi conduzida com organismos de água doce (Macken *et al.*, 2008). Essa realidade não é muito diferente para os compostos anti-incrustantes, pois o número de estudos com organismos de água doce é bem superior àqueles em que foram utilizadas espécies de ambientes salobros e salinos.

Com relação aos novos anti-incrustantes como o Irgarol 1051 e Diuron, são poucos os estudos com espécies marinhas e estuarinas. Dos poucos trabalhos publicados que utilizaram estes compostos em ensaios agudos, a maioria foi com espécies de fitoplâncton e macroalgas, visto que existe uma maior preocupação quanto à ação inibidora da fotossíntese nestes organismos. Porém, apesar da sua ação herbicida relativamente bem conhecida, seus efeitos sobre espécies animais não-alvo já foram reconhecidos (Voulvoulis *et al.*, 1999; Konstantinou & Albanis, 2004; Mochida & Fujii, 2009a; Mochida & Fujii, 2009b).

Recentemente, Arai *et al.* (2009) publicaram um trabalho que reúne as mais diversas informações a respeito da ecotoxicologia de biocidas anti-incrustantes. Entretanto, em se tratando de ensaios de toxicidade aguda com espécies de invertebrados marinhos, esta publicação não é muito abrangente. Dos estudos apresentados, a maioria apresenta dados sobre exposições ao TBT, dentre as espécies apresentadas estão 3 espécies de bivalves - *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* e *Mytilus edulis* (Thain, 1983); 8 de anfípodos (todos oriundos do trabalho de Ohji *et al.*, 2002a); 3 de copépodos - *Acartia tonsa* (Bushong, Jr. *et al.*, 1987), *Eurytemora affinis* (Hall *et al.*, 1988) e *Nitocra spinipes* (Linden *et al.*, 1979), 3 de misídeos - *Metamysidopsis elongata*, *Americamysis bahia* (= *Mysidopsis bahia*) e *Acanthomysis sculpta* (USEPA, 2003) e 1 espécie de caranguejo - *Crangon crangon* (Thain, 1983). Para o Irgarol 1051 aparece apenas um estudo deste tipo com a espécie *Artemia salina* (Okamura *et al.*, 2000) e para o Diuron com o crustáceo *Palaemon serratus* (Bellas *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que estes não são os únicos estudos da avaliação de toxicidade de TBT, TPT, Irgarol 1051 e Diuron, de que se tem registro na literatura mundial. Porém por se tratar de uma publicação recente e especificamente tratando do tema ecotoxicologia dos biocidas anti-incrustantes (*Ecotoxicology of Antifouling Biocides*), serve para ilustrar a dimensão da carência de informação sobre os efeitos agudos em espécies animais de ambientes marinhos e estuarinos. Portanto, adicionalmente merecem destaque os estudos com os novos anti-incrustantes realizados por Karlsson *et al.* (2006), que testaram Irgarol e Diuron frente ao copépodo *Nitocra spinipes*; o trabalho de Key *et al.* (2008) que avaliaram a toxicidade do Irgarol sobre *Palaemonetes pugio* e os trabalhos com o Diuron frente *Artemia salina* (Koutsaftis & Aoyama, 2007) e *Artemia franciscana* (Koutsaftis & Aoyama, 2008).

Tendo em vista essa carência de estudos de toxicidade envolvendo agentes anti-incrustantes, não é surpresa a ausência de estudos com espécies neotropicais, uma vez que são poucas as espécies aquáticas da região neotropical que têm sua sensibilidade determinada independentemente da substância. Essa falta de parâmetros ecotoxicológicos exige a utilização de dados bibliográficos sobre a toxicidade que geralmente inclui espécies cujos habitat são muito diferentes dos encontrados no Brasil (Araújo & Nascimento, 1999).

Sendo assim, o presente estudo visou avaliar os efeitos tóxicos dos compostos TBT, TPT, Irgarol 1051 e Diuron em três espécies nativas de microcrustáceos (copépodo *Acartia tonsa*, misídeo *Mysidopsis juniae* e tanaidáceo *Kalliapseudes shubartii*) através de ensaios de toxicidade aguda. Dessa forma, será possível avaliar a periculosidade destes 4 compostos sobre espécies neotropicais e fornecer subsídios para a inclusão de limites de concentrações seguras nas legislações ambientais pertinentes (no caso dos que não constam na legislação) ou o questionamento dos limites já existentes (no caso dos que já constam).

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 ORGANISMOS-TESTE

1.2.1.1 Acartia tonsa

A espécie *Acartia tonsa* (Dana, 1849) pertence ao Subfilo Crustacea, classe Copepoda e à ordem Calanoida. Os copépodes são considerados um dos produtores secundários mais importantes dos ecossistemas marinhos, uma vez que representam espécies chave na transferência de nutrientes e energia nos ecossistemas marinhos, pois representam um elo entre o fitoplâncton e níveis tróficos superiores de muitos ecossistemas aquáticos (Webber & Roff, 1995; deYoung *et al.*, 2004). Durante as estações quentes os copépodos calanóides, especialmente a espécie *A. tonsa*, são os organismos dominantes do mesozooplâncton de águas costeiras, tanto em número, quanto em biomassa (Mauchline *et al.*, 1998). Em estações frias sua ocorrência diminui drasticamente.

O copépodo eurialino *A. tonsa* apresenta uma distribuição ampla, tendo sido registrada sua presença desde a costa do Canadá até a Argentina, no Oceano Atlântico, além de sua ocorrência também ter sido reportada no norte no Oceano Pacífico (Sabatini, 1990). Esta espécie foi enquadrada como cosmopolita a pouco mais de uma década (Razouls *et al.*, 2000).

Este organismo é facilmente cultivado em laboratório (Støttrup & Norsker, 1997; Kaminski, 2004), além de ser uma das espécies de copépodo mais estudadas no mundo (Mauchline *et al.*, 1998). Embora essas características mostrem que o animal é adaptável as mais diversas condições ambientais, foi demonstrado que a espécie é sensível a uma variedade de substâncias tóxicas (Ward *et al.*, 1979; Andersen *et al.*, 1999; Medina & Barata, 2004). Por essa razão, o copépodo *A. tonsa* tem sido mundialmente utilizado na avaliação da toxicidade de compostos que podem ingressar no ambiente marinho (Heinle & Beaven, 1980; Bushong, Jr. *et al.*, 1987; Christoffersen *et al.*, 2003; Tsui & Chu, 2003; Willis & Ling, 2003; Pinho *et al.*, 2007), tanto na avaliação de toxicidade aguda (Webber & Roff, 1995; Sverdrup *et al.*, 2002; Medina & Barata, 2004), quanto nos ensaios de toxicidade crônica (Ward *et al.*, 1979; Kusk & Petersen, 1997; Lindley *et al.*, 1999; Willis & Ling, 2003). O ensaio de toxicidade aguda com este organismo está normatizado pela *International Standardization Organization* (ISO, 1999).

1.2.1.2 Mysidopsis juniae

A espécie *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979) pertence ao Subfilo Crustacea, à Superordem Peracarida e à Ordem Mysida (anteriormente denominada Mysidacea). Esse organismo se assemelha aos camarões e é conhecido popularmente como camarões-gambá, pois possui uma pequena bolsa incubadora ventral (marsúpio) cuja função é armazenar ovos e filhotes. Já foram descritas 780 espécies de misídeos (=misidáceos), sendo que as espécies marinhas vivem agregadas e associadas a algas e gramíneas marinhas.

Os misídeos representam parte da dieta alimentar de muitas espécies de peixes, o que evidencia um importante elo nas diversas ramificação da teia trófica marinha (Barnes, 1996). *M. juniae* é uma espécie epibentônica de hábito onívoro, cuja principal característica morfológica é o formato do télson, que apresenta um tubérculo distal no ápice, que permite a distinção de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero.

Os misídeos são amplamente utilizados como organismos-teste em estudos ecotoxicológicos devido a características favoráveis como sensibilidade a vários agentes tóxicos, facilidade de manuseio e cultivo, desenvolvimento direto e ciclo de vida curto (Badaró-Pedroso *et al.*, 2002). Várias espécies de misídeos têm sido utilizadas em ensaios ecotoxicológicos em vários países, principalmente nos Estados Unidos onde, as espécies mais utilizadas e recomendadas, oficialmente em programas de monitoramento e avaliação de toxicidade, são *Americamysis bahia* (= *Mysidopsis bahia*), e *Holmesimysis costata* (USEPA, 2002a).

No Brasil, a utilização de *M. juniae* em ensaios de toxicidade teve início em 1989 através de estudos relacionados à biologia (alimentação e ciclo de vida) e determinação da sua sensibilidade ao zinco e ao dodecil sulfato de sódio (DSS) (Nipper *et al.*, 1993). Estes estudos resultaram na adaptação e padronização da metodologia com essa espécie, que em seguida foi normalizada e recomendada para os ensaios de toxicidade aguda (CETESB, 1992; ABNT, 2005a). Ensaios com misídeos têm sido utilizados no Brasil para a avaliação da toxicidade de uma série de agentes tóxicos, sejam eles compostos químicos ou misturas complexas (Badaró-Pedroso *et al.*, 2002).

1.2.1.3 Kalliapseudes shubartii

A espécie *Kalliapseudes schubartii* (Mané-Garzón, 1949) pertence ao Subfilo Crustacea e à Ordem Tanaidacea. Possui dimorfismo sexual em que os machos apresentam níveis distintos de alometria dos quelípodos, o que caracteriza a existência de dois tipos de machos (Tipo I e II), sendo que apenas os do Tipo II são reprodutivos (Fonseca

& D'Incao, 2003b). Faz parte da infauna de ambientes estuarinos e marinhos, apresentando distribuição gregária na camada superficial do sedimento (Fonseca & D'Incao, 2003a). Trata-se de um organismo escavador, tubícola, cujo hábito alimentar é filtrador. Tem por estratégia de refúgio cavar tubos em “U” de até 15 cm quando adultos, e de pequenas profundidades quando jovens (Asmus, 1984b). Esta espécie pode ser encontrada desde o Rio da Prata no Uruguai até o Rio de Janeiro (Asmus, 1984a).

O tanaidáceo *K. schubartii* é um organismo de grande abundância e representatividade ecológica no seu habitat, pois apresenta um importante papel na cadeia alimentar estuarina. Estes animais são fortemente predados ao longo de todo o ano (Fonseca & D'Incao, 2006), principalmente por outras espécies de crustáceos e peixes (Asmus, 1984b). Estudos realizados na região Sul do Brasil demonstraram que o período reprodutivo dessa espécie ocorre durante a primavera e o verão, com crescimento populacional rápido e longevidade podendo atingir 12 meses (Fonseca & D'Incao, 2003b).

Apesar desta espécie não ser normatizada nacional ou internacionalmente, sua inclusão no presente estudo se deve principalmente à sua importância ecológica nos sistemas estuarinos da região Sul do Brasil, em especial o estuário da Lagoa dos Patos. Além disso, é utilizada regularmente como organismo em estudos ecotoxicológicos para avaliar a qualidade de águas de ambientes marinhos e estuarinos (Zamboni & Costa, 2002).

Em um estudo de avaliação de danos ambientais, esta espécie foi utilizada na estimativa de toxicidade das águas contaminadas por ácido sulfúrico (lançado pelo navio “Bahamas” em 1998) nas águas do Porto de Rio Grande (Zamboni *et al.*, 1998). Além disso, Montagnolli *et al.* (2004) utilizaram *K. schubartii* para avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, encontrando resultados satisfatórios para a sua utilização como organismo-teste.

Em testes de toxicidade aguda estes animais se mostraram sensíveis a poluentes químicos isolados, como os metais pesados cádmio e cromo (Costa, 1997) e compostos orgânicos, como surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (Fillmann *et al.*, 2003).

Adicionalmente, é importante destacar que o tanaidáceo *K. schubartii* tem sido utilizado desde o ano de 2005 como o principal organismo-teste nos ensaios ecotoxicológicos do programa de monitoramento ambiental do porto de Rio Grande¹. Nesse projeto, a espécie é utilizada em ensaios agudos, tanto com sedimento integral, quanto de elutriado, água intersticial e amostras de coluna d'água.

¹ Projeto Nº 237/PR/05B - Programa de Monitoramento Ambiental para o Canal de Acesso ao Porto de Rio Grande, Bacia de Evolução do Porto Novo e da Área de Descarte do Material Dragado – Ecotoxicologia.

1.2.2 MANUTENÇÃO DOS CULTIVOS

Os cultivos dos organismos utilizados estavam estabelecidos no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática - CONECO, situado no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

A água marinha utilizada tanto para os cultivos quanto para os ensaios de toxicidade aguda em água foi obtida da Estação Marinha de Aquicultura (FURG), onde era coletada diretamente do ambiente (Praia do Cassino, Rio Grande – RS) e filtrada (60µm). Em laboratório, a água foi novamente filtrada em cartuchos de 1 µm de porosidade. Quando necessário, a salinidade foi ajustada com água destilada ou sal marinho artificial (CORALIFE® *Scientific Grade Marine Salt, Energy Savers Unlimited, INC.*).

1.2.2.1 Cultivo de *Acartia tonsa*

Os organismos iniciais e para manutenção dos cultivos foram coletados na praia do Cassino e/ou Saco do Justino (Rio Grande – RS), sendo triados no Laboratório de Zooplâncton do IO – FURG. O cultivo de *A. tonsa* era mantido em sala climatizada à temperatura de 20°C e fotoperíodo controlado (12C:12E). Os organismos eram cultivados em água marinha filtrada (1 µm) com salinidade 30 e aeração constante. Diariamente, era fornecida uma dieta mista das microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana* (Kaminski, 2004). As condições gerais estão demonstradas na Tabela 5.

Para a manutenção da qualidade do cultivo, renovações totais de água foram realizadas semanalmente. Neste procedimento os copépodos adultos foram selecionados com auxílio de uma rede com malha de 300 µm, enquanto que os ovos, náuplios e copepoditos foram separados do recipiente contendo indivíduos adultos através de uma rede com 45 µm de malha.

Tabela 5: Condições gerais para o cultivo de *Acartia tonsa*.

Requisitos	Condições
Sistema de cultivo	Monoespecífico
Água de cultivo	Água do mar filtrada
Aeração	Suave e constante
Temperatura	20°C
Alimentação	Dieta mista de microalgas
Fotoperíodo	12C:12E
Salinidade	30
Renovação água	Semanal

1.2.2.2 Cultivos de *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana*

Para o fornecimento diário ao cultivo de *A. tonsa*, as espécies de microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana* tiveram que ser cultivadas no laboratório CONECO. Os inóculos iniciais e de manutenção para os cultivos destas microalgas foram obtidos junto ao Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos do IO – FURG. A manutenção destes organismos foi garantida através de novas inoculações (a cada dois dias), a partir do cultivo em andamento no laboratório CONECO. As culturas eram preparadas em água do mar filtrada (1 µm) e autoclavada, contendo o meio de cultivo F/2 (Guillard, 1975). As algas foram cultivadas em erlenmeyers de 1000 mL com aeração suave, e mantidas em câmaras de germinação sob temperatura (20°C) e iluminação constantes. As condições do cultivo de microalgas estão apresentadas na Tabela 6.

Antes de serem adicionadas ao cultivo de *A. tonsa*, uma alíquota de 100 mL de cada um dos meios contendo as microalgas foi observada sob microscópio óptico em câmara de Neubauer. Deste modo, pôde ser estimada a densidade algal e assim fornecer quantidade de alimento suficiente para os copépodos. Além disso, esta técnica permitiu avaliar a qualidade do cultivo e verificar a presença de contaminação por outros organismos.

Tabela 6: Condições gerais para cultivo de *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana*.

Requisitos	Condições
Sistema de cultivo	Contínuo, monoespecífico
Água de cultivo	Água do mar filtrada, autoclavada e enriquecida com meio F/2 (Guillard, 1975)
Aeração	Suave e constante
Temperatura	20°C
Iluminação	1000-1800 lux
Fotoperíodo	12C:12E
Salinidade	25 – 30
Renovação (Inóculo)	Três vezes por semana

1.2.2.3 Cultivo de *Mysidopsis juniae*

O cultivo de *M. juniae* foi conduzido em sala climatizada sob condições controladas de temperatura (25°C) e fotoperíodo (12C:12E). Os organismos eram mantidos em recipientes de vidro com capacidade de 3 a 6 litros com água marinha filtrada (salinidade 35) e aeração suave e contínua. A Tabela 7 apresenta resumidamente as condições do cultivo de *M. juniae*.

Como alimento para os organismos foram utilizados náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp. (72 horas de vida) enriquecidos com óleo de peixe (ômega 3) e óleo de fígado de bacalha. Para obtenção dos nauplios, 24 horas antes de serem fornecidos aos misídeos aproximadamente 0,25 g de cistos de *Artemia* sp (cistos INVE) foram colocados em béqueres de 500 mL (proporção de 0,5 g L⁻¹) e adicionados cada um dos óleos na proporção de 0,1mL para cada 100mL de água, (ABNT, 2005a). Para garantir a qualidade do cultivo, renovações de água foram realizadas semanalmente.

Tabela 7: Condições gerais para o cultivo de *Mysidopsis juniae*.

Requisitos	Condições
Sistema de cultivo	Monoespecífico
Água de cultivo	Água do mar filtrada (1µm)
Aeração	Suave e constante
Temperatura	24°C
Alimentação	Náuplios de <i>Artemia</i> sp*
Fotoperíodo	12C:12E
Salinidade	35
Renovação água	Semanal

*Enriquecidos com óleo de fígado de bacalhau e ômega 3.

1.2.3 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ORGANISMOS

1.2.3.1 *Kalliapseudes schubartii*

Os organismos foram coletados no estuário da Lagoa dos Patos em um marisma com substrato areno-lodoso, onde a espécie é abundante. Para obtenção dos animais foram retiradas camadas superficiais de sedimento (10 a 20 cm de profundidade) com o auxílio de uma pá e em seguida peneirado em malha de 500 µm, sendo o material retido (organismos e detritos vegetais) acondicionado em baldes com água do local e levados imediatamente ao laboratório.

Em laboratório, foi realizada uma primeira triagem para separar os organismos dos detritos. Para tanto, o balde contendo o material coletado em campo foi agitado suavemente a fim de desprender os tanaidáceos dos tubos e também dos detritos. Com o auxílio da peneira plástica, os indivíduos emersos foram capturados e transferidos para recipientes de vidro contendo água do local filtrada. Posteriormente, foi feita uma segunda triagem com o auxílio de uma pipeta de boca larga, para separar os organismos em classes de tamanho (> 6 mm), com o intuito de evitar o uso de indivíduos juvenis, os quais são mais sensíveis.

Os organismos separados para os ensaios foram mantidos em sala climatizada à temperatura de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo controlado (12C:12E), com aeração constante. Como os testes foram realizados a salinidade 15, e normalmente a salinidade no local de coleta era inferior, o recipiente contendo os tanaidáceos recebeu, a cada duas horas, uma alíquota de solução salina, preparada com sal artificial (CORALIFE[®] *Scientific Grade Marine Salt, Energy Savers Unlimited, INC.*), a fim de elevar a salinidade em três unidades a cada adição da solução.

Após atingir a salinidade 15, os organismos foram aclimatados por um período de aproximadamente 24 horas. Nos casos onde o período de adequação de salinidade somada à aclimação tenha sido superior a 2 dias, foi fornecido aos animais uma solução alimentar contendo ração para camarão e ração microfloculada para alevinos (alconALEVINOS[®]).

1.2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EXPOSIÇÃO

As soluções-estoque dos compostos estudados foram preparadas gravimetricamente em acetona. Esse procedimento foi adotado em virtude da baixa solubilidade desses compostos em água. A escolha deste solvente foi baseada nos resultados obtidos em testes de toxicidade preliminares.

1.2.4.1 Soluções-estoque de TBT e TPT

As soluções-estoque com concentração de 5 mg L⁻¹ foram previamente preparadas através da dissolução, em acetona, dos padrões de Cloreto de Tributilestanho (TBT) e o Cloreto de Trifenilestanho (TPT) de grau analítico (pureza > 98%: *Sigma-Aldrich*).

1.2.4.2 Soluções-estoque de Irgarol 1051 e Diuron

As soluções-estoque (4 mg L⁻¹) foram previamente preparadas através da dissolução, em acetona, dos padrões de Irgarol 1051 (pureza > 98%) e o Diuron (pureza 99,5%) de grau analítico (*Sigma-Aldrich*).

1.2.4.3 Soluções de exposição

As soluções utilizadas para exposição dos organismos foram preparadas imediatamente antes da realização de cada ensaio. Para tanto, foi utilizada água do mar natural filtrada (porosidade do filtro de 1 μm) com a salinidade ajustada de acordo com a metodologia de cada organismo utilizado. Todas as soluções foram preparadas de modo à concentração de acetona não exceder 0,05% do total da concentração de exposição. Foi constatado em testes preliminares que esta concentração não apresenta toxicidade aguda aos organismos testados, o que poderia levar a conclusões errôneas acerca da toxicidade dos compostos avaliados.

1.2.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES POR ANÁLISES QUÍMICAS

As concentrações das soluções-estoque foram confirmadas por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para tanto, uma alíquota de 100 μL de cada uma das soluções foi transferida para um balão volumétrico de 1 mL, cujo volume foi aferido com hexano. A mistura foi então transferida para um frasco com tampa septada, o qual foi lacrado e purgado com nitrogênio para o processo de derivatização. Utilizando-se uma seringa, foram adicionados a cada frasco 2 mL de uma solução de Brometo de Pentil Magnésio 2 M em éter dietílico. Os frascos foram então agitados vigorosamente com o auxílio de um vortex e deixados em repouso por 20 minutos. Transcorrido o tempo de repouso, foram adicionados aos frascos 10 mL de água Milli-Q e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado (37%), a fim de extinguir o excesso do reagente.

A mistura derivatizada foi então submetida a uma extração líquido-líquido, fazendo uso de 5 mL de hexano (x3). Os três extratos foram reunidos em um tubo graduado e evaporados lentamente sob fluxo de nitrogênio, até atingirem o volume de 500 μL . Em seguida, foram adicionados 100 ng do padrão interno, e avolumados a 1 mL. Finalmente, as soluções foram transferidas para pequenos frascos de tampa septada e injetados em triplicata ($n=3$) no sistema cromatográfico. A quantificação foi feita a partir das médias obtidas para cada uma das réplicas, por padronização interna.

1.2.6 LAVAGEM DO MATERIAL UTILIZADO

Todo material (exceto plástico) utilizado seguiu o protocolo de lavagem estabelecido no laboratório de Ecotoxicologia (CONECO). Este material foi primeiramente lavado com água da torneira, seguida por imersão em detergente neutro (10% v/v) por 24

horas, seguido por enxagues com água da torneira (5x), lavagem com acetona, lavagem com água da torneira (5x) e lavagem com álcool etílico (95%). Após ser enxaguada com água da torneira (5x), a vidraria foi então imersa em ácido nítrico (HNO_3 10% v/v) por 24 horas. Ao final esse material é lavado com água da torneira (5x), seguido de água destilada (5x).

O material plástico, por sua vez, foi imerso em detergente neutro (10% v/v) por 24h. Em seguida, foi lavado com água da torneira (5x), álcool etílico 95%, seguido por novo enxágüe com água da torneira (5x) e ao final lavado com água destilada (5x).

1.2.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE

1.2.7.1 Ensaio preliminares – Toxicidade dos solventes

Foram conduzidos testes preliminares para avaliar a toxicidade da acetona e do etanol, a fim de se estabelecer qual solvente seria utilizado na preparação das soluções-teste. As soluções de acetona e etanol foram baseadas na estimativa da concentração máxima que teriam nas soluções-teste com os compostos anti-incrustantes. Os percentuais de acetona e etanol em cada solução de exposição foram os seguintes: 0,03; 0,06; 0,13; 0,25 e 0,50%. Os ensaios foram realizados seguindo metodologias de ensaios ecotoxicológicos para cada organismo, os quais serão apresentados adiante.

1.2.7.2 Ensaio preliminares – Determinação das faixas de concentração

Foram realizados ensaios preliminares para estabelecer as faixas de concentrações dos compostos estudados, em que seriam expostos os organismos-teste. As soluções foram preparadas com as concentrações variando em progressão geométrica na razão 10. Quando os resultados foram satisfatórios, ou seja, (1) a maior concentração apresentou mortalidade semelhante ao aceitável para o Controle e (2) menor concentração em que não houve sobrevivência, foi feito o estreitamento da faixa de concentração. Deste modo, foram realizados novos ensaios, utilizando a razão 2 ou 5.

1.2.7.3 Ensaio com substância de referência

O surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) foi utilizado como substância de referência nos ensaios de toxicidade aguda em matriz aquosa. Este procedimento permitiu avaliar a sensibilidade tanto dos organismos coletados em campo (*K. schubartii*) quanto dos cultivados em laboratório (*A. tonsa*, *M. juniae*). Esta substância é rotineiramente

utilizada no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática – CONECO como substância de referência em ensaios de toxicidade com compostos orgânicos.

Os organismos cultivados em laboratório (*A. tonsa* e *M. juniae*) tiveram sua sensibilidade avaliada mensalmente, visando a construção de uma carta-Controle para cada espécie. Nos casos em que os ensaios com substância de referência não foram realizados concomitantemente aos ensaios definitivos com os compostos anti-incrustantes, o intervalo entre estes experimentos não excedeu 14 dias. Para os tanaidáceos, a sensibilidade do lote de organismos coletados foi avaliada paralelamente aos ensaios com os compostos estudados.

Os resultados dos testes de sensibilidade foram expressos através da concentração letal mediana a 50% dos organismos expostos (CL50), após o intervalo de tempo estabelecido nos métodos de ensaio de toxicidade de cada espécie. Estes dados foram úteis para dar sequência no estabelecimento das cartas-control, em que os limites de aceitabilidade de resultados estão compreendidos entre ± 2 desvios padrão da média dos resultados (CL50) pretéritos, com essa substância de referência. Além disso, a precisão analítica, bem como a variabilidade de sensibilidade dos organismos foram avaliadas através do coeficiente de variação (CV), o qual é calculado da seguinte forma: $CV(\%) = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100$.

1.2.7.4 Ensaio toxicológico com o copépodo eurialino *Acartia tonsa*

Os ensaios de toxicidade aguda com a espécie *A. tonsa* foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita em *International Standardization Organization* (ISO, 1999). Portanto, a partir do cultivo de *A. tonsa* foram retirados copépodos adultos, sem distinção de sexo, utilizando-se uma rede com malha de 300 μm , sendo transferidos para placas de petri, da qual foram selecionados cuidadosamente os indivíduos que apresentavam natação ativa. Em cada frasco-teste foram colocados 10 organismos com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Para facilitar a visualização dos organismos foi utilizada uma caixa de iluminação inversa.

Os ensaios para determinação das faixas de concentração foram realizados nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e TPT, e de 1,0; 10; 100; 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol 1051 e Diuron. Deste modo, foi constatado que os compostos dentro da mesma classe de biocida apresentam grau de toxicidade na mesma ordem de magnitude sobre *A. tonsa* (COEs: TBT ~ TPT, e herbicidas: Irgarol ~ Diuron). Portanto, as concentrações das soluções-teste foram de 0,01; 0,05; 0,25; 1,25 e 6,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os COEs, e de 200, 400, 800, 1600 e 3200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os herbicidas. Água marinha filtrada com

salinidade 30 foi utilizada como água de diluição e Controle. Foram preparadas quatro réplicas para cada concentração em frascos de vidro com volume total de 50 mL

O ensaio foi mantido por 48 horas em câmaras de germinação com temperatura constante (20°C) e fotoperíodo controlado (12C:12E). Ao final do período experimental, os frascos foram analisados e a mortalidade dos organismos quantificada em cada concentração. A mortalidade foi considerada através da observação dos animais que se apresentaram imóveis, mesmo após um leve estímulo com a pipeta *Pasteur* de pequeno calibre. Contudo, estes organismos foram observados sob estereomicroscópio óptico em caráter confirmatório.

1.2.7.5 Ensaio toxicológico com o misídeo *Mysidopsis juniae*

Os ensaios de toxicidade aguda com a espécie *Mysidopsis juniae* foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita na norma ABNT-15308 (ABNT, 2005a). Deste modo, organismos entre 1 e 8 dias de vida foram selecionados a partir do cultivo, sem distinção de sexo. Os indivíduos foram transferidos para cubas de vidro com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, de onde foram separados aleatoriamente dez animais que foram transferidos para béqueres de 400 mL contendo 200 mL da solução-teste.

As concentrações de exposição dos compostos anti-incrustantes utilizadas nos ensaios com misídeos foram as mesmas previamente estabelecidas para o copépodo *A. tonsa*: 0,01; 0,05; 0,25; 1,25 e 6,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e TPT; 200, 400, 800, 1600 e 3200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol e Diuron. Para cada concentração de cada um dos compostos foram utilizadas quatro réplicas. Como água de diluição e Controle, foi utilizada água marinha filtrada com salinidade 35.

O ensaio foi mantido em uma câmara de germinação por um período de 96 horas, sob as mesmas condições do cultivo dessa espécie (Tabela 7), com exceção da aeração. Os organismos foram alimentados diariamente durante o período de exposição com 20 a 30 náuplios de *Artemia* sp. para cada misídeo. Transcorrido o tempo de exposição, foi avaliada a taxa de mortalidade para cada concentração, identificada pela ausência de movimento do animal após estímulo físico.

1.2.7.6 Ensaio toxicológico com o tanaidáceo *Kalliapseudes schubartii*

Para os ensaios de toxicidade aguda com a espécie *K. schubartii* os organismos foram retirados das cubas de aclimação e transferidos para placas de petri, das quais foram selecionados organismos adultos entre 0,7 e 1,0 cm de comprimento. Um cuidado especial foi tomado para não fossem selecionadas fêmeas ovígeras, pois se sabe que o

vitelo presente nos ovos iria agregar maior quantidade dos contaminantes (já que as substâncias testadas são lipossolúveis) e, dessa forma, iria interferir diretamente nos resultados.

Foram distribuídos aleatoriamente 10 organismos em frascos de vidro contendo 100 mL da solução-teste com diferentes concentrações dos anti-incrustantes. Foram preparadas quatro réplicas para cada concentração de exposição, sendo 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e TPT, e de 500, 1000, 5000, 10000, 20000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol 1051 e Diuron.

Os ensaios foram conduzidos em câmara de germinação com temperatura constante (21°C) e fotoperíodo controlado (12C:12E). A condição dos tanaidáceos em cada frasco foi verificada a cada 24 horas a partir do início do teste. Caso houvesse mortalidade esta foi registrada e os indivíduos mortos retirados. Ao final de 96 horas de exposição foram contabilizadas as mortalidades totais para cada concentração.

1.2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A toxicidade de cada agente anti-incrustante foi avaliada através da CL₅₀ – 48h (concentração letal para 50% dos indivíduos em 48 horas) para *A. tonsa* e CL₅₀ – 96h para *M. juniae* e *K. schubartii*. Conforme foi verificado na literatura (Nipper, 2002; USEPA, 2002a; ASTM, 2008c), em cada ensaio ecotoxicológico foram analisadas algumas condições para determinar qual método estatístico seria utilizado na estimativa da CL₅₀ e os limites de 95% de confiança.

Foi dada preferência na utilização do método de Probitos (Abou-setta *et al.*, 1986), por este ser um método estatístico paramétrico e, portanto, a concentração-resposta é descrita por uma função matemática. Para que este método pudesse ser utilizado é necessário ter duas ou mais porcentagens de efeito observado. Em seguida, foi verificado se este método era apropriado para o conjunto de dados obtido. Dessa forma, a normalidade de suas distribuições foi analisada através do teste de Chi-quadrado.

Caso não fossem atendidas as premissas supracitadas, foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Este é um método estatístico não-paramétrico, ou seja, ao invés de adotar modelos matemáticos, a relação concentração-resposta é assumida através da distribuição monotônica das porcentagens de efeito observado.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas *Probit Method vers. 1.5* e *TSK - Trimmed Spearman-Kärber vers. 1.5*, os quais estão disponíveis em www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm#.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS AOS SOLVENTES

Os resultados dos ensaios agudos para avaliar a sensibilidade dos organismos quanto aos efeitos letais dos solventes etanol e acetona, estão apresentados na Tabela 8. Os organismos da espécie *Acartia tonsa* expostos ao etanol apresentaram 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas. Por este motivo, não foram realizados ensaios para testar a sensibilidade dos outros organismos utilizados (*Mysidopsis juniae* e *Kalliapseudes schubartii*) frente a esta substância. Por outro lado, a acetona não foi agudamente tóxica para nenhuma das 3 espécies testadas nas concentrações a que foram expostas (Tabela 8). Em função destes resultados preliminares, o solvente acetona foi o escolhido para ser utilizado no preparo das soluções-estoque dos compostos anti-incrustantes.

Tabela 8: Percentual de sobrevivência dos organismos aos solventes etanol e acetona, após 48 horas de exposição para *Acartia tonsa* e 96 horas de exposição para *Mysidopsis juniae* e *Kalliapseudes schubartii*.

Concentração (%)	Etanol		Acetona		
	<i>A. tonsa</i>	<i>A. tonsa</i>	<i>M. juniae</i>	<i>K. schubartii</i>	
0,50	0	90	90	100	100
0,25	0	85	100	100	100
0,13	0	75	95	100	100
0,06	0	90	100	100	100
0,03	0	90	80	100	100
Controle	100	100	90	100	100

1.3.2 ENSAIOS COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Os resultados dos ensaios com Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) estão apresentados na Tabela 9. Com estes dados foi possível dar continuidade à elaboração da carta-controle para a espécie *A. tonsa* (Figura 4), iniciada com o trabalho de Ihara (2008). A carta-controle para *M. juniae* ainda não foi totalmente implantada devido à baixa taxa de reprodução dos misídeos no período deste estudo.

Devido à utilização da espécie *K. schubartii* como organismo-teste nos ensaios ecotoxicológicos do monitoramento ambiental do porto de Rio Grande, a sensibilidade

destes animais frente ao DSS tem sido frequentemente avaliada. Portanto, o laboratório CONECO dispõe de uma carta-controle para esta espécie (Figura 5), a qual foi importante na confirmação da aceitabilidade do lote de organismos utilizados neste estudo.

Tabela 9: Resultados obtidos a partir dos ensaios agudos de toxicidade com Dodecil sulfato de Sódio, para as espécies *Acartia tonsa*, *Mysidopsis juniae* e *Kalliapseudes schubartii*, no período de execução deste trabalho.

Ensaio	CL ₅₀ - 48h (mg L ⁻¹)	CL ₅₀ - 96h (mg L ⁻¹)	
	<i>Acartia tonsa</i>	<i>Mysidopsis juniae</i>	<i>Kalliapseudes schubartii</i>
1	1,48 (1,32 - 1,61)	2,35 (1,97 - 2,79)	40,8 (35,4 - 47,0)
2	1,44 (1,25 - 1,65)	2,29 (1,97 - 2,79)	42,8 (53,6 - 33,3)
3	1,44 (1,25 - 1,64)	1,85 (1,58 - 2,17) ^a	46,3 (50,0 - 40,9)
4	1,43 (1,29 - 1,60)	3,16 (2,65 - 3,75) ^b	47,9 (50,9 - 35,2)
Média	1,45	2,36	44,44
CV(%)	1,53	23,81	7,30

Os intervalos de confiança (95%) estão entre parênteses.

^a Resultados obtidos por Ihara (2008).

^b Resultados obtidos por Rossato (2008).

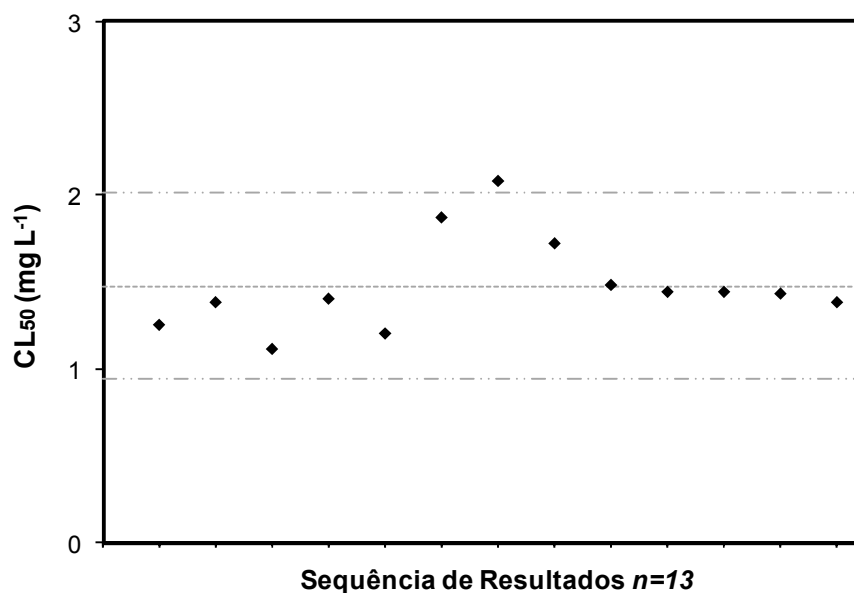


Figura 4: Controle da sensibilidade do cultivo de *Acartia tonsa* à substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). A linha contínua representa a média acumulada das CL₅₀ - 48h (n=12) e as linhas tracejadas os respectivos limites inferiores e superiores (± 2 desvio padrão).

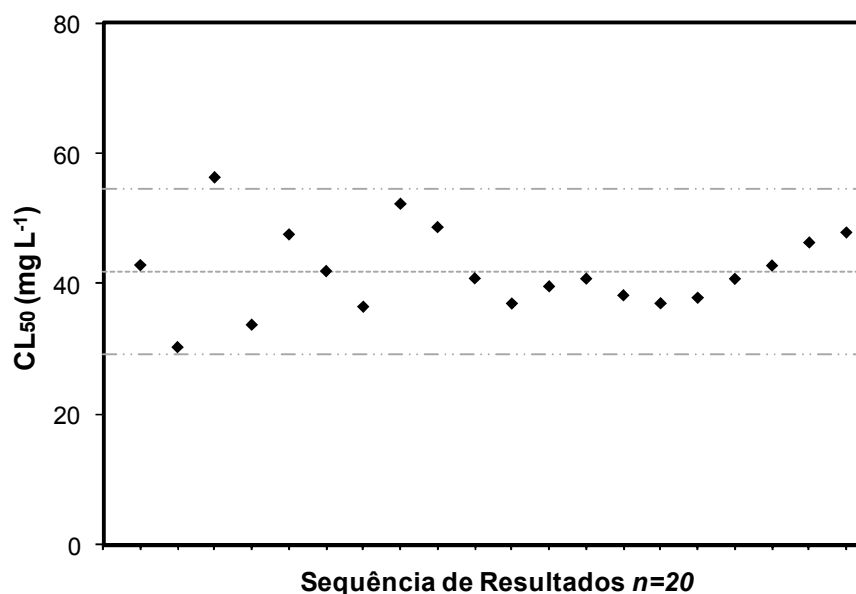


Figura 5: Controle da sensibilidade de *Kalliapseudes schubartii* à substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). A linha contínua representa a média acumulada das CL₅₀ - 96h (n=40) e as linhas tracejadas os respectivos limites inferiores e superiores (± 2 desvio padrão).

1.3.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM OS COMPOSTOS ANTI-INCRUSTANTES

1.3.3.1 *Acartia tonsa*

Foram conduzidos um total de cinco ensaios com *A. tonsa* frente a cada composto anti-incrustante. No entanto, apenas três foram considerados como definitivos (n=3), uma vez que a realização de experimentos prévios (n=2) foram com intuito de identificar os limites de efeito dos compostos estudados. As CL₅₀ estimadas a partir das concentrações nominais estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados de CL₅₀ obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie *Acartia tonsa* frente aos compostos anti-incrustantes.

Ensaio	TBT ($\mu\text{g L}^{-1}$)		TPT ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Irgarol ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)
1	1,1	(0,56 - 1,6)	2,7	(1,9 - 3,9)	833	(607 - 1145)	1075	(402 - 2875)
2	1,9	(1,4 - 2,5)	3,5	(2,2 - 5,3)	714	(448 - 1156)	1486	(890 - 2483)
3	1,9	(1,4 - 2,6)	2,2	(1,0 - 5,0)	648	(376 - 1117)	1387	(1171 - 1641)

1.3.3.2 *Mysidopsis juniae*

Durante o desenvolvimento deste trabalho o cultivo de *M. juniae* sofreu grande decaimento na reprodução, de tal maneira que o número de indivíduos produzidos não foi suficiente para a reposição das matrizes, o que culminou na escassez total destes organismos. Devido a estes problemas, todos os ensaios realizados foram considerados definitivos, diferente do apresentado para *A. tonsa*. Além disso, número de ensaios conduzidos foi menor (n=1-3), limitando-se a duas repetições com os COEs e um único ensaio com cada um dos herbicidas (Tabela 11).

No mesmo período em que este estudo estava sendo desenvolvido, Rossato (2008) conduziu ensaios com a espécie *M. juniae* frente ao TBT e ao Irgarol como parte do seu trabalho de conclusão do curso de graduação². Embora seus experimentos tenham sido realizados em outro laboratório e utilizado outro lote de organismos, as soluções às quais os misídeos foram expostos tinham sido preparadas a partir das soluções-estoque elaboradas no presente trabalho. Dessa forma, os valores das CL₅₀ obtidos nesses experimentos foram aproveitados (com autorização da autora) para uma análise mais robusta dos resultados. A Tabela 11 apresenta as CL₅₀ estimadas mediante a estes ensaios, a partir das concentrações nominais dos agentes anti-incrustantes.

Tabela 11: Resultados de CL₅₀ obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie *Mysidopsis juniae* frente aos compostos anti-incrustantes.

Ensaio	TBT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	TPT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Irgarol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)
<i>M. juniae</i>	CL ₅₀ (\pm IC - 95%)	CL ₅₀ (\pm IC - 95%)	CL ₅₀ (\pm IC - 95%)	CL ₅₀ (\pm IC - 95%)
1	2,0 (1,4 - 2,6)	3,9 (3,1 - 4,9)	360 (246 - 466)	589 (442 - 784)
2	2,1 (1,8 - 2,5)	4,5 (3,4 - 5,9)	310 (310 - 420) ^a	
3	2,2 (1,9 - 2,6) ^a			

^aValores encontrados por Rossato (2008) no período de realização deste estudo.

1.3.3.3 *Kalliapseudes schubartii*

As concentrações necessárias para avaliar a toxicidade dos compostos anti-incrustantes frente à espécie *K. schubartii* foram relativamente altas. Após os experimentos preliminares, os intervalos dos gradientes de concentração que foram estabelecidos variaram de 1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e TPT, e de 500 a 20000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol 1051 e Diuron.

² Ensaio realizado no Laboratório de Ecotoxicologia – LETOX da UNIVALI/Itajaí, durante estágio obrigatório, como um dos requisitos para conclusão do curso de Oceanologia da FURG.

Diante destes valores, optou-se por restringir o número de ensaios com estes organismos em duas repetições além do experimento prévio, visto que são necessárias altas concentrações para se obter as CL₅₀ – 96h para esta espécie. Além disso, estes níveis não refletem os valores passíveis de serem encontrados no ambiente. Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos a partir dos três ensaios (n=3) com tanaidáceos.

Tabela 12: Resultados de CL₅₀ obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie *Kalliapseudes schubartii* frente aos compostos anti-incrustantes.

Ensaio	TBT ($\mu\text{g L}^{-1}$)		TPT ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Irgarol ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)	CL ₅₀	(\pm IC - 95%)
1	21,2	(14.0-327)	32,9	(9.15-50.6)	5930	(2740 - 630)	8480	(6246 - 0343)
2	23,7	(19.2 - 28.3)	34,4	(29.7-38.5)	5661	(4011-7779)	7560	(6570 - 8710)
3	25,7	(22.7 - 28.8)	34,7	(26.8-43.9)	5806	(4831-8572)	7064	(4831 - 8571)

1.4 DISCUSSÃO

Os ensaios ecotoxicológicos podem apresentar variações atribuídas, por exemplo, à variabilidade intrínseca da sensibilidade dos organismos-teste utilizados. Dessa forma, conforme é estabelecido em qualquer estudo que vise avaliar a toxicidade de substâncias, os organismos utilizados neste estudo tiveram sua sensibilidade avaliada frente a uma substância de referência (Controle positivo) para que, nos ensaios com os compostos anti-incrustantes, este fator de erro fosse excluído.

Os resultados com a substância de referência DSS foram coerentes com os obtidos em estudos pretéritos realizados no laboratório CONECO, apresentando uma variação dentro dos limites de aceitabilidade (LC₅₀ média \pm 2 desvio padrão) (Tabela 8, Figuras 4 e 5). Os coeficientes de variação (CV) calculados foram satisfatórios, já que estudos ecotoxicológicos são considerados com uma boa reprodutibilidade, quando a variação dos resultados expressa pelo CV é menor que 30% (*Environment Canada, 2007a*).

As sensibilidades apresentadas pelas espécies planctônicas aos COEs (TBT e TPT) foram similares, visto que as CL₅₀ calculadas mostraram valores muito próximos. Para o TBT, as CL₅₀ apresentaram limites de confiança extremamente próximos, praticamente sobrepostos (Tabelas 10 e 11). Para o TPT, a espécie *A. tonsa* se mostrou ligeiramente mais sensível que *M. juniae* (Tabelas 10 e 11).

Com relação aos novos anti-incrustantes (Irgarol e Diuron), a espécie *M. juniae* parece ser mais sensível. Tanto para o Irgarol quanto para o Diuron, os valores das CL₅₀ para *A. tonsa* foram cerca de duas vezes maiores que os encontrados para *M. juniae* (Tabelas 10 e 11). Porém, conforme citado anteriormente, o cultivo de misídeos apresentou sérios problemas durante o desenvolvimento deste trabalho, o que limitou o número de ensaios com estes compostos. Estas comparações foram feitas com base em dois experimentos com Irgarol (sendo que um deles realizado em outro laboratório) e um único para Diuron. Dessa forma, são necessários ensaios complementares para confirmar se a espécie *M. juniae* realmente é mais sensível frente a estes compostos. No entanto, não é correto utilizar este tipo de comparação para a avaliação da sensibilidade das espécies entre os compostos isoladamente, uma vez que as condições gerais dos ensaios não foram as mesmas. Além do período de exposição, as diferenças de temperatura (Tsui & Chu, 2003) e de salinidade (Bianchini *et al.*, 2004) exercem extrema importância para a biodisponibilidade e conseqüentemente na toxicidade do contaminante. Estudos realizados com COEs (Inaba *et al.*, 1995; Kwok & Leung, 2005) e herbicidas (Koutsaftis & Aoyama, 2008) mostraram diferentes níveis de efeitos sobre organismos da mesma espécie, quando expostos ao mesmo contaminante em condições ambientais.

Apesar do apresentado acima, é interessante mencionar a menor sensibilidade do tanaidáceo bentônico *K. schubartii* em comparação às outras espécies estudadas. Considerando os COEs, os valores para o tanaidáceo encontram-se de 12 a 15 vezes acima da CL50 para *A. tonsa* e cerca de 10 vezes maior que o observado para *M. juniae* (Tabelas 10, 11 e 12). Com relação ao Irgarol, a maior amplitude de sensibilidade encontra-se entre as espécies *K. schubartii* e *M. juniae*, em que os níveis de toxicidade observados apresentam uma diferença em torno de 15 vezes (Tabelas 10, 11 e 12). O mesmo pode ser observado para o Diuron, cuja toxicidade para o misídeo é pouco mais que 13 vezes superior a do tanaidáceo (Tabelas 10, 11 e 12). Além disso, os níveis ambientais que os compostos estudados teriam que apresentar em água para serem potencialmente perigosos a este organismo, estão longe de corresponder aos níveis até o momento detectados no ambiente (Konstantinou & Albanis, 2004).

Cabe ressaltar que, pelo fato de o *K. schubartii* ser uma espécie que vive junto ao sedimento, formando tubos em substratos inconsolidados, é provável que a sensibilidade determinada pelos testes realizados em água seja diferente da sofrida pelo organismo em seu ambiente natural. Nesta condição natural, o organismo poderá ser exposto ao contaminante por 3 importantes vias: pela água, presente no interior do tubo e em constante renovação com a camada logo acima do sedimento; por contato direto com o sedimento, ao se deslocar por este substrato; bem como através do consumo de alimento contaminado (material em suspensão). Além disso, os invertebrados bentônicos selecionam como alimento partículas com alta concentração de matéria orgânica, que devido à grande afinidade com os compostos estudados, podem apresentar níveis elevados no ambiente (este aspecto será abordado em mais detalhe no Capítulo 3).

Por outro lado, não pode ser descartada a possibilidade de que os tanaidáceos pudessem estar mais vulneráveis durante os testes à assimilação dos contaminantes via água, do que quando presentes no ambiente. Esta hipótese está baseada no fato de que durante a verificação diária dos sistemas-teste com os tanaidáceos, foi observada uma intensa atividade natatória e movimento ativo dos seus apêndices, que possivelmente está relacionado à ausência de substrato para estes organismos refugiarem-se. Dessa forma, é possível que este aumento da atividade natatória somada à um possível aumento na ventilação dos tecidos respiratórios (pleópodos), podem ter resultado em um aumento na eficiência de captação dos contaminantes presentes neste meio líquido.

Embora o objetivo deste trabalho não tenha sido avaliar particularmente a sensibilidade de *K. schubartii* em relação às outras espécies, esta diferença permaneceu nos ensaios com a substância de referência (DSS), onde a CL50 média apresentada para o tanaidáceo foi aproximadamente 25 vezes maior que para *A. tonsa* e *M. juniae*. Esta tendência tem sido relatada em outros estudos, em que, basicamente, a espécie *K.*

schubartii tem se mostrado pouco sensível quando comparada com diferentes espécies. Rossato (2008) verificou que, a concentração do composto orgânico Pireno necessária para causar efeito para esta espécie precisa ser 10 vezes maior que para o copépodo *A. tonsa*. Nesse mesmo trabalho, a sensibilidade apresentada pela *A. tonsa* quando exposta ao Zinco é por volta de 18 vezes acima da observada para *K. schubartii*.

Ainda em caráter comparativo, pode-se destacar um estudo ecotoxicológico realizado pela CETESB (1990c), em que foram utilizadas as espécies *K. schubartii* e *M. juniae* para avaliar a toxicidade de sedimentos (pelo método de elutriato) e água intersticial oriundos do litoral norte do estado de São Paulo. Os resultados obtidos mostraram que as amostras apresentaram toxicidade aguda para a espécie de misídeo, embora não tivesse sido observado qualquer efeito sobre *K. schubartii*. Na mesma época, Nipper *et al.* (1990b), utilizaram o anfípodo *Bathyporeiapus bisetosus* e o tanaidáceo *K. schubartii* em uma das primeiras pesquisas ecotoxicológicas com sedimento no Brasil, tendo relatado uma alta taxa de sobrevivência do tanaidáceo quando exposto aos sedimentos contaminados. Foi destacado também o fato destes organismos terem sido encontrados no estuário do Rio Cubatão, uma área reconhecidamente impactada.

Quando os efeitos dos compostos são comparados entre si, observa-se a mesma seqüência de toxicidade sobre as espécies, que pode ser resumida em ordem decrescente da seguinte forma: TBT > TPT > Irgarol 1051 > Diuron. Porém, a diferença no grau de toxicidade dos compostos varia para cada espécie, até mesmo entre os compostos pertencentes à mesma classe de biocida.

Para *A. tonsa*, os valores médios das CL₅₀ de TBT e TPT foram muito próximos e o padrão de resposta dos organismos foi muito semelhante, conforme pode ser observado na Figura 6. Por este motivo as médias dos resultados foram comparadas estatisticamente (ANOVA), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$). No entanto, os intervalos de confiança a 95% das CL₅₀ calculadas para estes compostos apresentam sobreposição (Tabela 10), portanto, analisando individualmente cada ensaio pode ser verificado que os níveis de toxicidade de TBT e TPT restringem-se ao mesmo intervalo de concentrações.

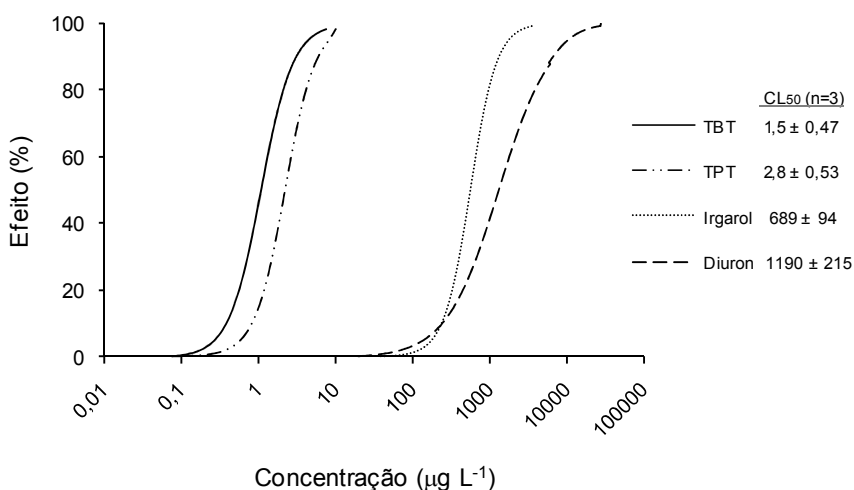


Figura 6: Relação concentração-resposta entre os compostos anti-incrustantes e a espécie *Acartia tonsa*. Os valores a direita das curvas são os valores médios das CL₅₀ ± desvio padrão

A toxicidade do Diuron foi ligeiramente menor que a do Irgarol 1051. Porém, da mesma forma que foi observado para os resultados com os COEs, houve sobreposição dos valores delimitados pelos intervalos de confiança calculados a 95% (Tabela 10). Através da Figura 6 pode ser observado que os herbicidas apresentam diferentes padrões concentração-resposta. O efeito em função do aumento progressivo das concentrações de Diuron foi nitidamente menos expressivo em comparação às mesmas concentrações de Irgarol.

Para uma melhor visualização dessa abordagem comparativa, as curvas que representam a relação concentração-resposta dos herbicidas sobre *A. tonsa* foram transformados em retas através do ajuste linear, em que os porcentagens de efeito observado foram transformados em probitos e as concentrações dos compostos em escala logarítmica (Figura 7). Neste caso pode ser observada a menor declividade da reta que representa Diuron, caracterizando uma menor intensidade dos efeitos entre uma determinada concentração e outra imediatamente superior. Já para o Irgarol, essa amplitude revela efeito muito mais pronunciado, o que é caracterizado pela maior inclinação da reta.

Segundo Rand *et al.* (1995), a menor inclinação pode representar uma substância cujos efeitos se manifestam algum tempo após o início da exposição ou devido a uma absorção deficiente pelo organismo. De qualquer forma, esta diferença na disposição das retas evidencia que possivelmente os compostos apresentam mecanismos de ação diferentes na fisiologia do animal. Além disso, o ponto de intersecção das retas ocorre próximo ao valor de número 5 no eixo das ordenadas (Probitos), valor que representa os

efeitos sobre 50% dos organismos expostos, conforme pode ser observado pelos valores das CL50 e variações nos intervalos de confiança obtidos.

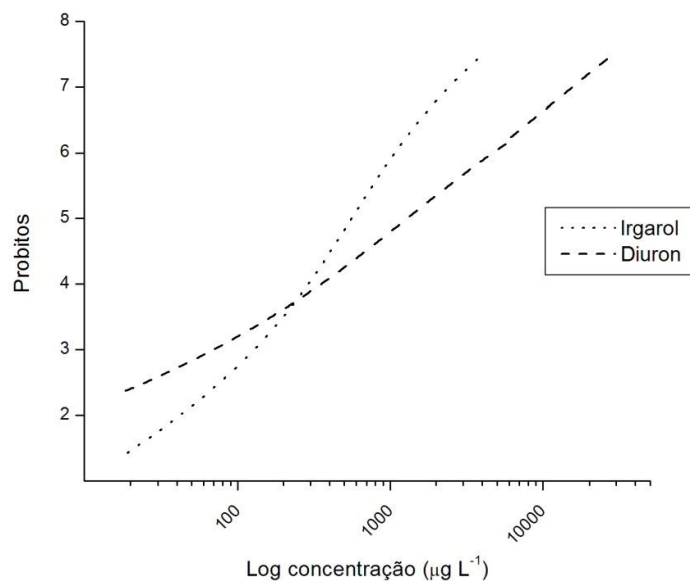


Figura 7: Ajuste linear da relação concentração-resposta para a espécie *Acartia tonsa* frente aos compostos Irgarol 1051 e Diuron.

O padrão de resposta entre as classes de anti-incrustantes foi um pouco diferente para espécie *M. juniae*. Embora o número de ensaios tenha sido restrito, foi possível interpolar graficamente as porcentagens de efeito em função da concentração de exposição (Figura 8). Através deste gráfico é possível observar que as curvas concentração-resposta dos COEs estão ligeiramente mais afastadas, em relação à mesma representação para *A. tonsa*. Além disso, os intervalos de confiança obtidos não apresentaram sobreposição, evidenciando uma diferença entre a toxicidade destes compostos frente à espécie *M. juniae*.

Os novos anti-incrustantes apresentaram um padrão semelhante nas curvas concentração-resposta (Figura 8). Diferente do que foi observado nas curvas de Irgarol e Diuron para *A. tonsa*, para *M. juniae* estes compostos parecem não apresentar mecanismos de ação distintos.

Maiores níveis de toxicidade dos COEs em relação aos novos anti-incrustantes também foram observados em outros estudos. Karlsson *et al.* (2006), testaram o composto organoestânico TBT (bis(tri-n-butyltin)(IV)óxido), o Irgarol e o Diuron e constataram que o primeiro foi cerca de 300 vezes mais tóxico que os dois últimos para a espécie de copépodo *Nitocra spinipes*, com valores da CL50 – 96h de 13 µg L⁻¹, 4500 µg L⁻¹ e 4000 µg L⁻¹, respectivamente. O mesmo foi observado em ensaios com larvas do crustáceo *Palaemon serratus* em que o TBT (CE50 – 48h de 17,52 µg L⁻¹) foi aproximadamente 170 mais tóxico que o Diuron (CE50 – 48h de 3044 µg L⁻¹) (Bellas *et al.*, 2005).

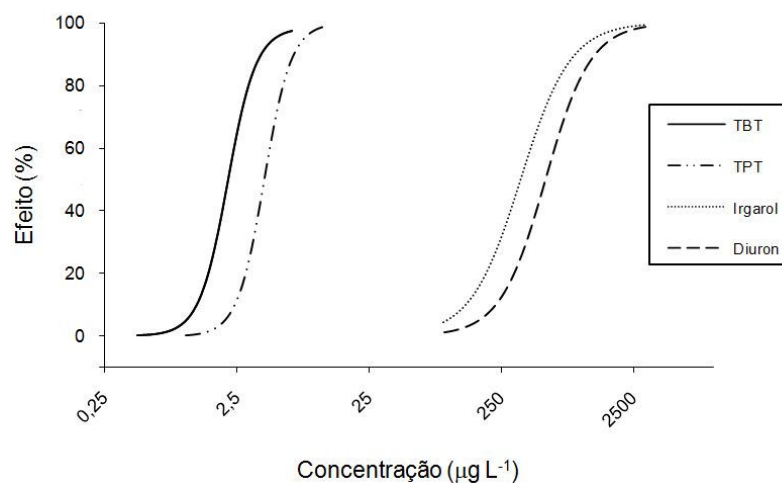


Figura 8: Relação concentração-resposta entre os compostos anti-incrustantes e *Mysidopsis juniae*.

Outro aspecto importante a ser considerado em relação à toxicidade de um composto, são os processos responsáveis por sua eliminação ou degradação do ambiente aquático. No ambiente marinho, por exemplo, a meia-vida em coluna d'água dos COEs varia de 7 a 19 dias (Harino *et al.*, 2009); aproximadamente 200 dias para o Irgarol 1051 (Hall *et al.*, 1999) e de 180 dias para o Diuron (Okamura *et al.*, 2003). Segundo esses estudos, as degradações dos compostos ocorrem principalmente através da radiação solar e pela presença de matéria orgânica. Portanto, devido a curta duração dos ensaios (48 a 96 horas) e à utilização de água filtrada (filtro de 1 µm), a degradação dos compostos pode ser considerada praticamente nula.

Por outro lado, a adsorção dos compostos nas paredes de vidro dos frascos-teste pode ter reduzido sua biodisponibilidade aos organismos durante os ensaios. Para avaliar esta hipótese, sub-amostras das soluções a que os organismos foram expostos foram retiradas no início e final dos testes. As amostras foram processadas e congeladas para posterior análise. No entanto, estas amostras ainda não foram analisadas, pois o método analítico para a determinação destes compostos em água do mar está em fase de desenvolvimento no CONECO. Desta forma, embora as concentrações das soluções-estoque tenham sido mensuradas antes da realização dos experimentos, as CL₅₀ dos compostos anti-incrustantes referentes à *A. tonsa*, *M. juniae* e *K. schubartii* foram calculadas com base nas concentrações nominais a que estes organismos foram expostos.

Entretanto, estudos que utilizaram *A. tonsa* para avaliar a toxicidade do TBT mostraram valores semelhantes aos obtidos (CL₅₀ – 48h média foi de 1,5 µg L⁻¹). Bushong, Jr. *et al.* (1987) obtiveram a CL₅₀ – 48h de 1,2 µg L⁻¹ a partir das concentrações reais de

exposição medidas por cromatografia gasosa. Para U'Ren (1983), a CL₅₀ encontrada foi um pouco menor (1,0 µg L⁻¹), porém a duração de seus ensaios foi de 96 horas.

Outras espécies de copépodos também tiveram sua sensibilidade testada perante o TBT. A CL₅₀ – 96h para *Nitocra spinipes* foi estimada em 13 µg L⁻¹ (Karlsson *et al.*, 2006), para *Eurytemora affinis* a CL₅₀ – 48h foi de 2,5 µg L⁻¹ (Bushong, Jr. *et al.*, 1987) e para *Tigriopus japonicus* a CL₅₀ – 96h foi de 0,15 µg L⁻¹ (Kwok & Leung, 2005), sendo este o menor valor para este grupo de organismos.

Com relação à toxicidade dos novos anti-incrustantes sobre espécies de copépodos, comparando os resultados obtidos neste estudo com os reportados na literatura, a espécie *A. tonsa* se apresentou muito mais sensível aos compostos Irgarol e Diuron. A CL₅₀ – 96h encontrada por Karlsson *et al.* (2006) para a espécie *Nitocra spinipes* foi de 4500 µg L⁻¹ para Irgarol e de 4000 µg L⁻¹ para o Diuron, enquanto que os valores médios das CL₅₀ – 48 h do presente estudo para *A. tonsa* foram de 689 µg L⁻¹ e 1190 µg L⁻¹, respectivamente. Além disso, o Diuron apresentou maior toxicidade que o Irgarol para *N. spinipes*.

Por outro lado, os valores de CL₅₀ – 96h para *M. juniae* são comparáveis aos reportados em outros estudos com misídeos. A agência ambiental Norte-americana (USEPA, 2003) utilizou a espécie *Mysidopsis bahia* (atualmente *Americamysis bahia*) frente ao TBT e obtiveram valores de CL₅₀ – 96h entre 1,1 e 2,2 µg L⁻¹, semelhante a encontrada no presente estudo (2,08 ± 0,13 µg L⁻¹). A sensibilidade do *M. juniae* frente ao Irgarol (CL₅₀ – 96h = 338 µg L⁻¹) também foi próxima à encontrada por Hall *et al.* (1999) para *Americamysis bahia* (= *Mysidopsis bahia*) com CL₅₀ – 96h de 400 µg L⁻¹). Estes dados podem ser uma importante base de comparação, em se tratando de organismos pertencentes ao mesmo nível taxonômico (Ordem Mysida), embora não tenham sido encontrados trabalhos semelhantes para os compostos TPT e Diuron.

Apesar do que foi discutido acima, são poucos os trabalhos que utilizaram microcrustáceos marinhos em ensaios com anti-incrustantes. Além disso, os estudos para os COEs quase sempre se limitam ao TBT. Ohji *et al.* (2002a; 2002b) realizaram experimentos com três espécies de anfípodos gammarídeos e encontraram valores de CL₅₀ de TBT um pouco superiores quando comparados aos copépodos e misídeos discutidos acima. As CL₅₀ – 48h obtidas foram de 17,8 µg L⁻¹ para a espécie *Jassa seatteryi*, 21,2 µg L⁻¹ para *Cerapus erae* e de 23,1 µg L⁻¹ para *Eohaustorioides* sp.. Em contrapartida, no mesmo estudo, os valores das CL₅₀ – 48h de TBT para anfípodos caprelídeos foram de 6,6 µg L⁻¹ para a espécie *Caprella equilibra*; 5,9 µg L⁻¹ para *Caprella danilevskii*, 4,6 µg L⁻¹ para *Caprella subinermis* e 1,3 µg L⁻¹ para *Caprella verrucosa*.

Estudo sobre a avaliação da toxicidade aguda de novos anti-incrustantes, como o Irgarol 1051 e o Diuron, sobre invertebrados marinhos são ainda mais escassos que para

COEs. Salvo os anteriormente citados, a maioria desses trabalhos se deu com animais de água doce. Além disso, a maioria dos trabalhos foram conduzidos com Diuron, e esta tendência é explicada pelo fato deste composto estar sendo amplamente utilizado na agricultura desde a década de 1950 (Yebra *et al.*, 2004), podendo ser lixiviados do solo e atingir níveis preocupantes em águas continentais.

Portanto, em se tratando de estudos com microcrustáceos de água doce, o Irgarol 1051 também apresentou maior toxicidade que o Diuron para a espécie *Daphnia magna*. Segundo Fernandez-Alba *et al.* (2002), as CL₅₀ – 48 h encontradas para esta espécie foram de 7300 µg L⁻¹ para Irgarol e de 8600 µg L⁻¹ para Diuron utilizando a espécie. Cabe ressaltar que a salinidade pode interferir na toxicidade dos compostos, já que interfere na cinética de comportamento e absorção dos contaminantes (ver revisão de Monserrat *et al.*, 2007). Portanto esses dados são meramente ilustrativos, não sendo bons modelos de comparação com as espécies expostas aos mesmos compostos no presente estudo.

A comparação entre os dados de toxicidade dos compostos anti-incrustantes e concentrações ambientais é importante para elucidar o perigo para espécies nativas. Apesar de Azevedo *et al.* (2004) terem encontrado a concentração de 0,138 µg L⁻¹ de Irgarol 1051 nas águas do rio Paraíba do Sul (município de Campos de Goytacazes, RJ), não há registro de estudos semelhantes em águas costeiras.

Em se tratando de COEs, os estudos de determinações ambientais na costa brasileira são basicamente em sedimentos (Godoi *et al.*, 2003a; Godoi *et al.*, 2003b; Almeida *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Felizzola *et al.*, 2008). No entanto, apesar da ausência de estudos envolvendo ensaios de toxicidade, os efeitos biológicos desses compostos relativos à sua presença em coluna d'água também têm sido demonstrados ao longo da costa brasileira (Fernandez *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2007a; Castro *et al.*, 2007b).

Por outro lado, existe uma ampla disponibilidade de artigos em que são reportadas concentrações de agentes anti-incrustantes ao redor do mundo. Tomando como base a sensibilidade dos organismos estudados no presente trabalho, as concentrações ambientais encontradas em estudos anteriores a proibição mundial dos COEs seriam suficientemente altas para causar danos severos às populações naturais. Neste sentido, merecem destaque os trabalhos onde foram encontradas concentrações de TPT acima de 1,22 µg L⁻¹ e de TBT acima de 3,20 µg L⁻¹ em Singapura (Basheer *et al.*, 2002); concentrações de TBT em 8,35 µg L⁻¹ em uma marina do Barém, nos Emirados Árabes (Hasan & Juma, 1992); 4,57 µg L⁻¹ no Porto de Baltimore, EUA (Matthias *et al.*, 1986); 3,94 µg L⁻¹ na Mariana Tichmarsh, em Londres (Dawson *et al.*, 1992); 1,00 µg L⁻¹ em Sai Kung, Hong Kong (Lau, 1991) e; 1,56 µg L⁻¹ em Côte d'Azur, France (Alzieu, 1991).

Com relação aos novos anti-incrustantes o cenário é bem diferente, pois os níveis ambientais de que se têm registro não seriam suficientes para causar toxicidade aguda para as espécies estudadas. Os níveis mais elevados de Irgarol de que se tem registro foram reportados por Basheer *et al.* (2002) em Singapura, onde detectaram concentrações de Irgarol em 13 de 26 locais amostrados ao redor da costa, em que variaram de 3,02 a 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já para o Diuron, os maiores níveis de que se tem registro estão entre 1 e 6,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ encontrados em estuários, ultrapassando os valores observados em marinas (Martínez *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001; Okamura *et al.*, 2003; Konstantinou & Albanis, 2004). Cabe a ressalva que os valores detectados de Diuron podem ser resultado não apenas do uso como agente anti-incrustante, mas também como herbicida no Controle de ervas em lavouras agrícolas, que podem atingir os corpos d'água através da lixiviação (Wauchope, 1978; Giacomazzi & Cochet, 2004).

Concentrações inferiores às supracitadas têm sido detectadas mundialmente conforme apresentado na revisão de Konstantinou & Albanis (2004). Porém, o uso destes compostos como anti-incrustantes é relativamente recente em comparação aos COEs. Deste modo, estes níveis podem sofrer um aumento devido à estabilidade natural e relativa persistência (Hall *et al.*, 1999; Okamura *et al.*, 2003). Adicionalmente, sabe-se que as tintas contendo os herbicidas geralmente apresentam metais em suas formulações, como cobre e zinco, justamente para potencializar seus efeitos sobre diferentes grupos de organismos (Thomas *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2000b; Chambers *et al.*, 2006).

Além disso, as interações toxicológicas com outros contaminantes encontrados nas áreas de risco podem acarretar respostas biológicas quantitativamente e qualitativamente diferentes da ação isolada dos biocidas. Estas interações não são mensuráveis quimicamente, mas podem potencializar os efeitos tóxicos, exercer efeitos aditivos e sinérgicos, elevando substancialmente a toxicidade sobre as espécies animais (Rand *et al.*, 1995).

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA EM MATRIZES AQUOSAS

2.1 INTRODUÇÃO

Em um ambiente aquático contaminado, os organismos estão geralmente expostos a níveis subletais dos agentes tóxicos, devido a fatores de diluição exercidos sobre esses compostos químicos. Este tipo de exposição, por sua vez, não levará o organismo a morte num curto período de tempo, mas poderá causar distúrbios bioquímicos, fisiológicos e/ou comportamentais nestes organismos. Esses efeitos não são facilmente detectados em ensaios de toxicidade aguda, visto que na maioria das vezes são respostas preliminares a ação dos compostos tóxicos, sendo necessário o uso de ensaios de toxicidade crônica, os quais permitem avaliar efeitos adversos mais sutis aos organismos expostos.

Entre as décadas de 1960 e 1970 foram desenvolvidos ensaios de toxicidade crônica, cuja duração contemplava o ciclo de vida completo de espécies de peixes e invertebrados (Cooney, 1995). Embora estes ensaios forneçam informações mais precisas acerca dos efeitos de substâncias aos organismos aquáticos, são muito onerosos. Isso levou ao desenvolvimento de ensaios de toxicidade crônica utilizando parte do ciclo de vida ou estágios iniciais de vida dos organismos-teste, caracterizados pela curta duração (que normalmente variam de 24 a 96 horas), baixo custo e por dispensar o fornecimento de alimentos (USEPA, 2002c).

Esses ensaios utilizam fases mais sensíveis do ciclo de vida dos organismos com desenvolvimento indireto (embrião, larva, jovem), pois a divisão celular mais intensa neste período torna o DNA mais acessível às alterações provocadas por fatores externos (Aragão & Araújo, 2006). Fatores como menor tamanho (maior relação superfície/volume), menor grau de desenvolvimento de mecanismos de detoxificação e diferenças em taxas de excreção, também contribuem para a maior sensibilidade nestes estágios iniciais (Cooney, 1995).

Ensaio ecotoxicológicos que utilizam gametas e embriões de equinodermos foram primeiramente estabelecidos em estudos que investigaram os efeitos de metais na fertilização e desenvolvimento destes organismos (Dinnel *et al.*, 1989). Porém, atualmente existe uma ampla variedade de métodos na literatura internacional onde são utilizadas células espermáticas e/ou embriões na exposição a diversas substâncias, que incluem metais, óleos e dispersantes (Prósperi & Nascimento, 2006).

Dentre os métodos existentes, os ensaios com embriões de ouriços têm sido utilizados como uma forma eficaz de avaliar a qualidade de águas e o potencial impacto

provocado por efluentes (Nipper *et al.*, 1993). A expansão da utilização desses organismos ocorreu devido à sensibilidade, facilidade de obtenção de gametas, baixo custo, rapidez na execução dos experimentos e ocorrência cosmopolita de espécies de ouriços (Dinnel & Stober, 1985). Devido a consistência dos ensaios com ouriço, muitos estudos têm sido conduzidos com base neste método. Kobayashi (1980), por exemplo, comparou a sensibilidade de vários estágios de desenvolvimento dos embriões de ouriços expostos a agentes químicos isolados, enquanto outros autores verificaram a toxicidade de amostras compostas como esgotos domésticos (Rachid, 1996), efluentes industriais (Prósperi, 1993) e água de produção de petróleo (Badaró-Pedroso, 1999).

Em relação aos compostos anti-incrustantes, apesar da grande maioria dos estudos serem direcionados aos efeitos agudos (Fent, 1996a; Mochida & Fujii, 2009a; Mochida & Fujii, 2009b) na década de 1980, já havia sido comprovado o efeito subletal do TBT sobre populações naturais de ostras e gastrópodes (Alzieu *et al.*, 1986).

Estudos mais recentes mostraram que concentrações extremamente baixas de TBT (10 ng L^{-1}) podem prejudicar o desenvolvimento embrionário da espécie de ouriço *Paracentrotus lividus* (Marin *et al.*, 2000). Outros autores também têm realizado ensaios de toxicidade crônica com ouriço-do-mar frente ao TBT (His *et al.*, 1999; Kobayashi & Okamura, 2002; Bellas *et al.*, 2005), ao Irgarol 1051 (Kobayashi & Okamura, 2002) e ao Diuron (Manzo *et al.*, 2006). Apesar do interesse atual em relação os efeitos subletais dos agentes anti-incrustantes, o conhecimento dos mecanismos fisiológicos está longe de ser completamente entendido (Horiguchi, 2009).

Cabe ressaltar que até o momento, os estudos crônicos utilizando embriões de ouriços-do-mar foram realizados com espécies de regiões temperadas, havendo uma carência com relação a este tipo de estudo com espécies neotropicais. Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos sub-letais dos compostos TBT, TPT, Irgarol 1051 e Diuron sobre a espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, através de ensaios de toxicidade crônica de curta duração com embriões. Dessa forma, os resultados podem auxiliar na tomada de decisões com relação os níveis permissíveis destes compostos nos ambientes costeiros.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 ORGANISMO-TESTE (*Lytechinus variegatus*)

A espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816), não apresenta dimorfismo sexual, tendo carapaça regularmente hemisférica e achatada inferiormente, de cor verde com as zonas inter-ambulacrais e os espaços entre os poros mais claros, e coloração dos espinhos variando desde o verde até púrpura arroxeado com tons esverdeados. Essa espécie é bastante comum na região do Caribe e na Costa Atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do Norte (EUA) até o estado de Santa Catarina no Brasil (Giordano, 1986). Ocorre na região litorânea sobre substratos arenosos e lodosos, apresentando-se fértil o ano todo, viabilizando assim a execução de ensaios com gametas e embriões.

2.2.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ORGANISMOS

Os exemplares de ouriços-do-mar foram coletados por mergulho livre nos arredores da Ilha-das-Palmas, localizada no município do Guarujá, estado de São Paulo. Para o transporte até o local de coleta foi utilizado um barco com motor de popa. Aproximadamente 20 indivíduos foram coletados para garantir a obtenção de 3 machos e 3 fêmeas com óvulos maduros. Em seguida, os organismos foram acondicionados em caixas com água do próprio local de coleta e imediatamente transportados para o laboratório no Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da UNESP - Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP – São Vicente).

No laboratório, os animais foram transferidos para tanques com aeração e mantidos em temperatura constante (25 ± 2 °C). Para alimentação dos animais foi fornecido a macroalga da espécie *Ulva lactuca*, colhidas no local de coleta dos ouriços.

2.2.3 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

2.2.3.1 Ensaio com substância de referência

A sensibilidade do lote *L. variegatus* foi avaliada através de testes de toxicidade com as substâncias de referência sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), as quais são utilizadas em procedimento padrão do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da UNESP. Esses experimentos

foram realizados em paralelo aos testes com os compostos anti-incrustantes, em que foram avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento embrio-larval do ouriço.

2.2.3.2 *Ensaio de toxicidade crônica com embriões de Lytechinus variegatus*

Os testes de toxicidade crônica com a espécie *Lytechinus variegatus* foram realizados segundo o método normatizado pela CETESB (1999). Este ensaio consiste na exposição de ovos do organismo-teste a várias concentrações de um agente tóxico ou amostra ambiental, durante a totalidade do período de desenvolvimento embrionário, que apresenta variações de 24 a 28 horas.

A água de diluição para a realização dos experimentos foi proveniente de São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, com salinidade 34 ± 2 , a qual foi filtrada através de membranas de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$) e mantida sob aeração suave e à temperatura do teste ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). É importante salientar que a água marinha deste local tem sido utilizada há vários anos em testes de toxicidade com *L. variegatus* nos trabalhos realizados pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e como água de cultivo para o misídeo *Mysidopsis juniae*, mantido em laboratório nessa entidade (Prósperi, 2002).

2.2.3.2.1 *Obtenção dos gametas*

Primeiramente a superfície do animal foi lavada com a água de diluição para a remoção de fezes e outros detritos. Para induzir a liberação dos óvulos e do líquido espermático foram injetados 3 mL de solução 0,5 M de cloreto de potássio (KCl) na região perioral do ouriço, em pontos diametralmente opostos. Em seguida, o animal foi agitado suavemente, para que a solução de KCl se espalhasse pela cavidade celômica. A liberação dos gametas ocorre pelos gonóporos, localizados na superfície aboral do ouriço. A identificação sexual dos animais pôde ser notada através dos gametas liberados, sendo que os óvulos apresentam-se como um líquido viscoso, alaranjado e com granulação aparente; enquanto que o líquido espermático é leitoso e de cor esbranquiçada.

As fêmeas foram apoiadas sobre a superfície de béqueres de 400 mL completamente cheios com água de diluição, com a região aboral voltada para baixo de modo que os gonóporos ficassem imersos na água, onde os óvulos eram liberados e, por conseguinte, coletados. Os óvulos foram coletados durante aproximadamente 15 minutos, para evitar que os imaturos, geralmente liberados com a desova prolongada, se misturassem aos óvulos maturados.

Os espermatozóides foram coletados diretamente da superfície aboral do animal, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, e transferidos para um béquer onde foram mantidos resfriados em gelo até a sua utilização.

2.2.3.2.2 *Tratamento dos gametas*

2.2.3.2.2.1 *Óvulos*

Com o intuito de retirar impurezas e para a dispersão dos grumos, foi feita a lavagem dos óvulos através da passagem por uma peneira de 350 µm utilizando a água de diluição. Após a decantação dos óvulos, foi descartado o líquido sobrenadante seguido do acréscimo de água de diluição limpa, e repetido o processo por mais duas vezes.

Com uma pipeta *Pasteur* foi retirada uma sub-amostra dos óvulos de cada fêmea, que estavam em diferentes béqueres, sendo observadas ao microscópio a fim de determinar sua viabilidade. Os óvulos utilizados apresentaram-se redondos, lisos e de tamanho homogêneo.

2.2.3.2.2.2 *Espermatozóides*

O esperma de todos os machos selecionados foi homogeneizado com um bastão de vidro para o preparo da suspensão em água do mar. Este procedimento é necessário pois, antes da fecundação, os espermatozóides precisaram ser ativados, o que foi feito através da adição do líquido espermático (com auxílio de uma seringa de 1 mL) à água de diluição, na proporção de 1:50 (0,5 mL de esperma em 24,5 mL de água). Em seguida, a solução foi homogenizada com um bastão de vidro para a dissolução de grumos.

2.2.3.2.3 *Fecundação e obtenção dos ovos para os experimentos*

Para a realização do teste de desenvolvimento embrio-larval foi necessário promover a fecundação antes de sua exposição. Para isso, foi adicionado 1 mL da solução espermática ao béquer contendo os óvulos e, após aproximadamente cinco minutos, retirada da solução uma alíquota de 1 mL, a qual foi diluída em 99 mL de água de diluição (em proveta de 100 mL). Após agitação foram tomadas sub-amostras de 1 mL e dispostas em câmara de *Sedgwick-Rafter*, sendo observados 100 ovos dos quais foram contados os fecundados, sendo estes identificados pela presença de uma membrana a sua volta (membrana de fecundação) (Figura 9). A concentração de ovos por mL de solução foi estimada a partir da média entre a contagem de cada sub-amostra. Foi necessário determinar a concentração de ovos fecundados, uma vez que em cada tubo de ensaio (frasco-teste) deveriam ser adicionados aproximadamente 300 ovos.

2.2.3.2.4 Preparo das amostras

Nos frascos-teste foram adicionados 10 mL de solução-teste com concentrações nominais dos compostos biocidas, sendo 0,01; 0,05; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e TPT e 250; 500; 1000; 2000; 4000 e 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol e Diuron. Foram preparadas 4 réplicas para os biocidas e 8 réplicas para o Controle contendo apenas água de diluição. Dentre as réplicas do Controle, 4 foram utilizadas para avaliar o momento adequado para o encerramento do experimento. Um segundo Controle foi preparado, contendo acetona a 0,05%, cuja concentração foi baseada na concentração máxima que este solvente poderia estar presente nas soluções-teste. Em seguida, com auxílio de uma pipeta automática, o volume da suspensão contendo 300 ovos foi transferido para cada frasco-teste.

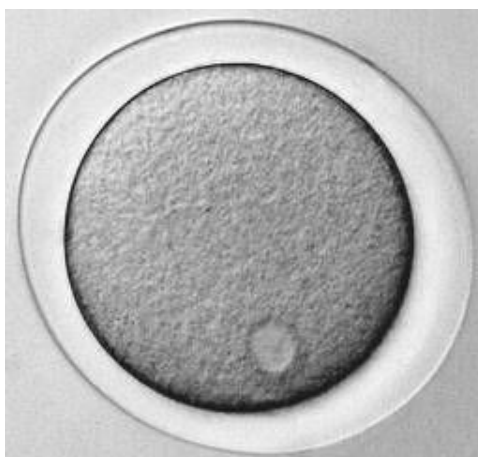


Figura 9: Ovo fecundado de *Lytechinus variegatus*

2.2.3.2.5 Encerramento do teste de toxicidade

A duração dos ensaios variou em torno de 24 horas, sendo este o tempo necessário para os embriões do ouriço *L. variegatus* se desenvolverem até o estágio larval *pluteus*. Os experimentos foram mantidos em câmara de germinação à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo 12C:12E. Ao final do experimento, 5 gotas de formaldeído tamponado com bórax foram adicionadas a cada réplica para a fixação dos embriões.

2.2.3.2.6 Avaliação das amostras e interpretação

O material foi observado sob microscópio, em câmaras de *Sedwick-Rafter*, onde foram avaliados os 100 primeiros embriões que apareceram no campo visual. Primeiramente procedeu-se à leitura do Controle, que serviu como referência para as

demais amostras. Posteriormente, a leitura do teste foi realizada aleatoriamente, sendo que esses dados foram registrados em uma ficha a parte.

No presente estudo, a interpretação dos efeitos observados em cada concentração não se limitou somente a observação da má formação da larva *pluteus*, sendo ampliada através da identificação dos estágios anteriores a *pluteus*. Este maior detalhamento dos estágios de desenvolvimento foi utilizado na tentativa de avaliar diferentes níveis de toxicidade. Para tanto, foram também identificados o tamanho dos *pluteus* (tamanho menor do que a larva normal), indivíduos deformados, assim como o desenvolvimento dos estágios de mórula (Figura 10f), blástula (Figura 10g) e gástrula (Figura 10h).

2.2.3.3 Aceitabilidade dos ensaios de toxicidade

Foram considerados válidos os ensaios que apresentaram as seguintes condições: (a) taxa de *pluteus* normais no Controle experimental maior ou igual à estabelecida no método, ou seja, acima de 80%; (b) resultados dos testes de toxicidade com a substância de referência, realizado em paralelo, dentro do intervalo delimitado de aceitabilidade (CL50 média \pm 2 desvio padrão).

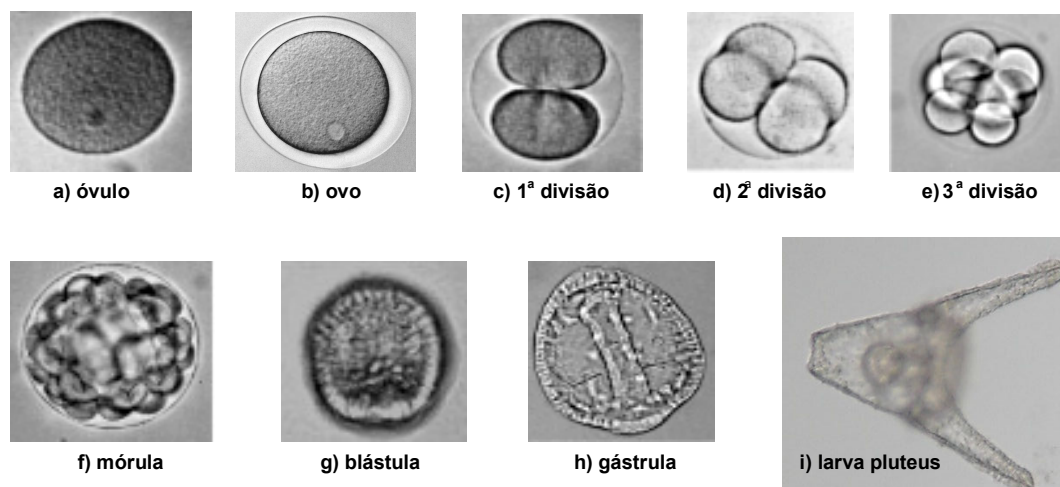


Figura 10: Estágios do desenvolvimento embrio-larval de *Lytechinus variegatus*.

2.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A comparação do percentual médio de *pluteus* de *L. variegatus* bem desenvolvidos entre os Controles (água de diluição e acetona), bem como as comparações estatísticas entre as concentrações de efeito e o Controle experimental foram realizadas através do teste *t*-student (com auxílio do programa *STATISTICA vers. 6.0*).

Através do número de embriões com desenvolvimento normal e o número de mal formados foi determinada a concentração de inibição a 50% dos organismos em 24 horas (CI₅₀ – 24 h). Para facilitar este procedimento foi utilizado o programa de computador *Linear Interpolation (ICp) Method* (disponível em www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm#).

O método de interpolação linear efetua uma análise de regressão, estabelecendo uma equação para relação concentração/resposta, que constitui a base para a interpolação das concentrações não testadas. Conseqüentemente, concentrações não utilizadas na avaliação dos efeitos podem ser estimadas. Além disso, a variabilidade nos tratamentos é utilizada para calcular os limites de confiança sobre as proporções de efeitos observados. Este método estatístico foi desenvolvido para auxiliar na análise de dados de ensaios de toxicidade crônica de curta duração, sendo utilizado para calcular a concentração do agente químico que causa determinada porcentagem de redução na reprodução ou desenvolvimento dos organismos (USEPA, 2002b).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CRITÉRIOS DE ACEITABILIDADE DOS ENSAIOS

2.3.1.1 Controle negativo

A porcentagem média de *pluteus* de *L. variegatus* bem desenvolvidos (com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo (Figura 10i) foi superior a 80% nos Controles experimentais, estando dentro do limite aceitável para esta metodologia. Este percentual foi observado tanto para a solução contendo acetona (0,05%), quanto para as réplicas apenas com água de diluição (água do mar filtrada) (Figura 11).

Através do teste *t*-student foi verificado que a média entre estes dois tratamentos não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Portanto, nos cálculos das CI₅₀ – 24h optou-se pelo agrupamento de ambos em um único grupo Controle.

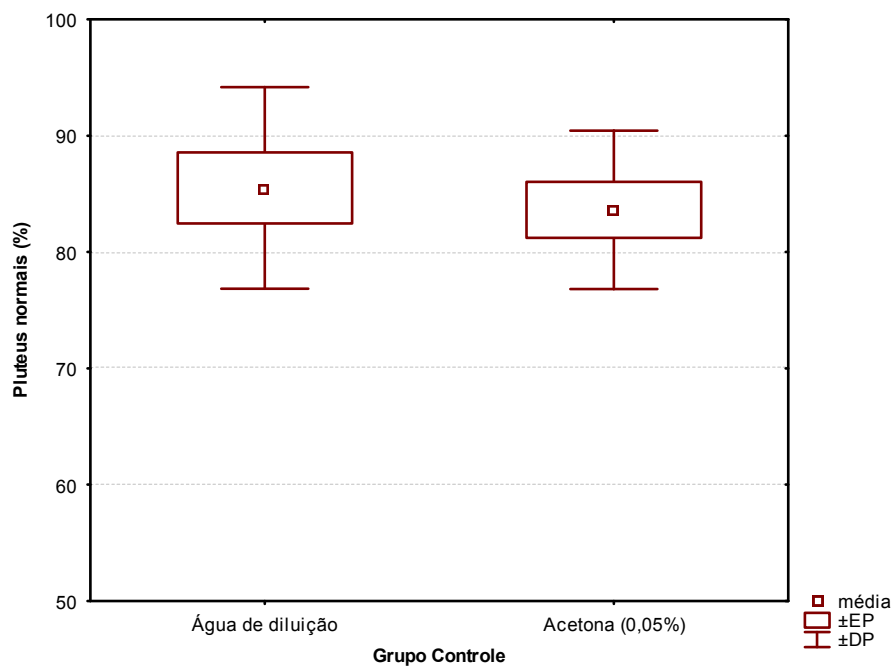


Figura 11: Valores médios de larvas *pluteus* normais observados nos Controles experimentais com água de diluição e 0,05% de acetona utilizados nos ensaios com *Lytechinus variegatus*. EP e DP correspondem ao erro padrão e desvio padrão, respectivamente.

2.3.1.2 Ensaio com substância de referência

Nos testes de sensibilidade com sulfato de zinco heptahidratado ($Zn_2SO_4 \cdot 7H_2O$) e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), as CI_{50} - 24h foram de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,42 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 13). Estes resultados foram condizentes com valores obtidos anteriormente no laboratório (NEPEA), com CI_{50} - 24h média de $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfato de zinco e $3,52 \text{ mg L}^{-1}$ para dicromato de potássio.

Tabela 13: Valores médios de CI_{50} - 24 h dos ensaios com as substâncias de referência sulfato de zinco heptahidratado e dicromato de potássio sobre *Lytechinus variegatus*.

Substância	CI_{50} - 24h (mg L^{-1})	I.C. ($\pm 95\%$)
$Zn_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0,057	(0,045 - 0,064)
$K_2Cr_2O_7$	3,42	(2,8 - 4,05)

2.3.2 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS ANTI-INCRUSTANTES

2.3.2.1 Estimativa das Concentrações de Inibição (CI_{50} - 24h)

Durante o período deste estudo foram realizados dois ensaios com cada composto organoestânico (TBT e TPT), dos quais, um em caráter preliminar e um definitivo ($n=1$). Para o Irgarol 1051 e o Diuron foram realizados três ensaios cada, dentre os quais dois foram considerados como definitivos ($n=2$). Os valores das CI_{50} dos compostos anti-incrustantes sobre o desenvolvimento de *L. variegatus* após 24 horas estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados de CI_{50} obtidos a partir dos ensaios conduzidos com organismos da espécie *Lytechinus variegatus* frente aos compostos anti-incrustantes.

Ensaio	TBT ($\mu\text{g L}^{-1}$)		TPT ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Irgarol ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	CI_{50}	($\pm IC - 95\%$)	CI_{50}	($\pm IC - 95\%$)	CI_{50}	($\pm IC - 95\%$)	CI_{50}	($\pm IC - 95\%$)
1 (Preliminar)	0,25	(0,19 - 0,28)	0,70	(0,38 - 1,05)	2964	(2131 - 3393)	6816	(5950 - 7073)
2	0,36	(0,32 - 0,38)	0,77	(0,73 - 0,81)	1487	(1436 - 1508)	5735	(5645 - 5828)
3	----	----	----	----	1348	(1314 - 1349)	3335	(3173 - 3409)

Quando expostos ao TBT, os embriões não apresentaram diferenças com relação ao Controle ($p > 0,05$) até a concentração de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$. Porém na concentração imediatamente acima ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), o efeito foi de 100% (Figura 12), ou seja, a partir desta concentração nenhuma réplica apresentou larvas *pluteus* bem desenvolvidas.

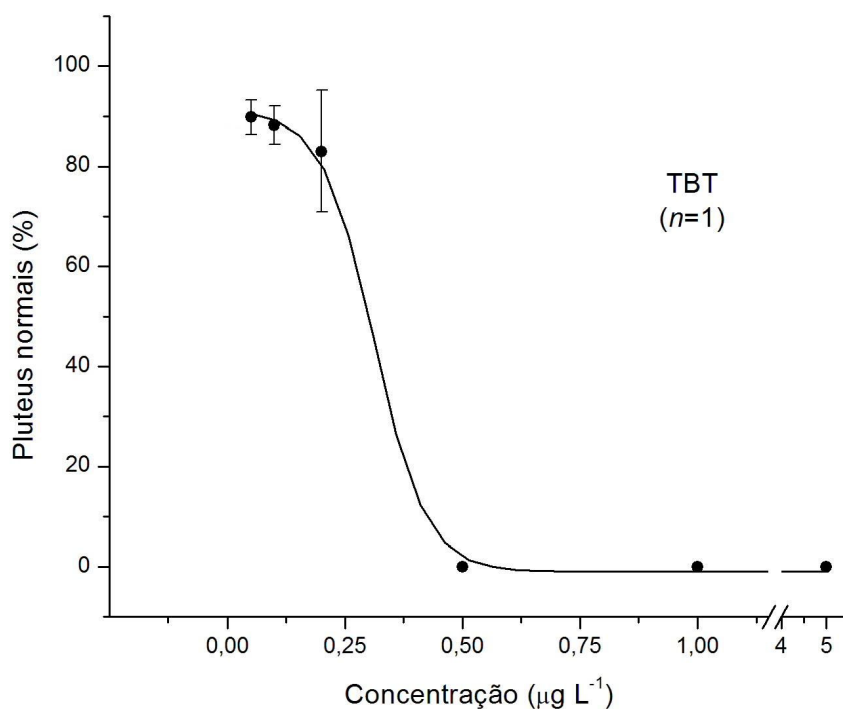


Figura 12: Percentual médio de larvas *pluteus* normais de *Lytechinus variegatus* observados nas diferentes concentrações de TBT. As barras de erro correspondem a desvio padrão.

O TPT não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a formação das larvas nas concentrações abaixo de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que já nesta concentração a porcentagem de efeito com relação ao Controle foi significativamente diferente ($p < 0,01$). Acima de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ todas as larvas apresentaram anomalias (100% de efeito observado; Figura 13).

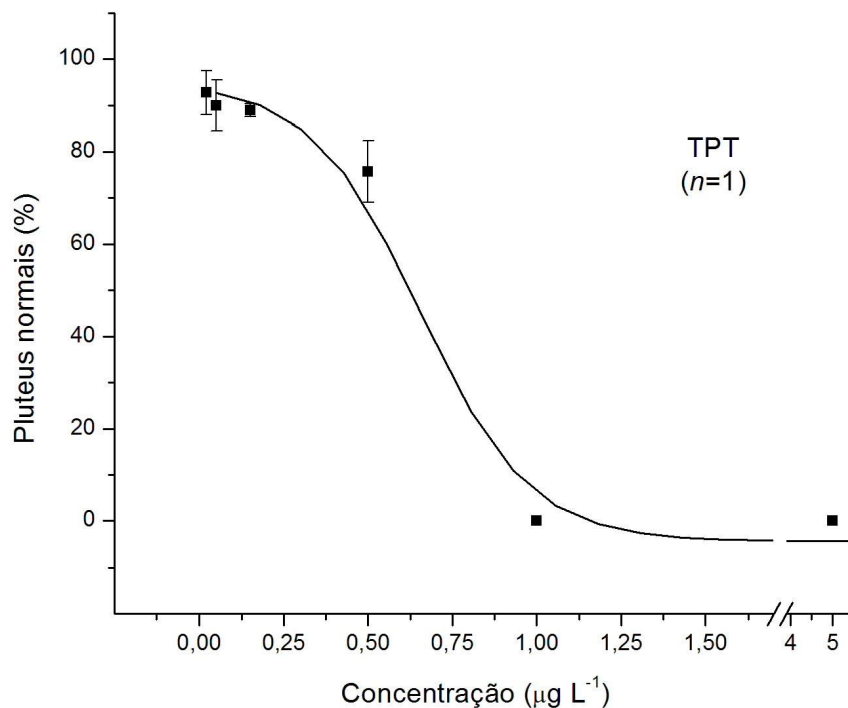


Figura 13: Percentual médio de larvas *pluteus* normais de *Lytechinus variegatus* observados nas diferentes concentrações de TPT. As barras de erro correspondem a desvio padrão.

A toxicidade do Irgarol permaneceu insignificante até $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Apesar da haver um pequeno aumento do número de larvas anormais a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, esta diferença não foi significativa com relação ao Controle ($p > 0,05$). A toxicidade aumenta fortemente acima de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo esta a concentração a partir da qual 100% das larvas apresentam anomalias (Figura 14).

Para o Diuron, pode ser observada diferença significativa em relação ao Controle ($p < 0,01$) a partir de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, acima deste valor as porcentagens de efeito mostraram uma tendência em aumentar progressivamente até a maior concentração utilizada ($8000 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 15).

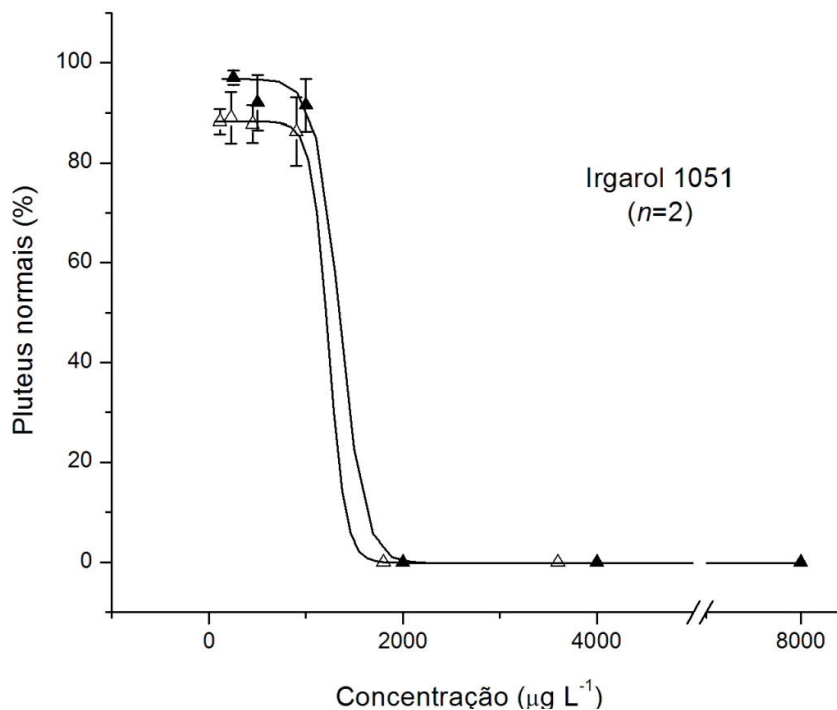


Figura 14: Percentual médio de larvas *pluteus* normais de *Lytechinus variegatus* observados nas diferentes concentrações de Irgarol 1051. Os símbolos em branco e preto representam diferentes ensaios. As barras de erro correspondem a desvio padrão.

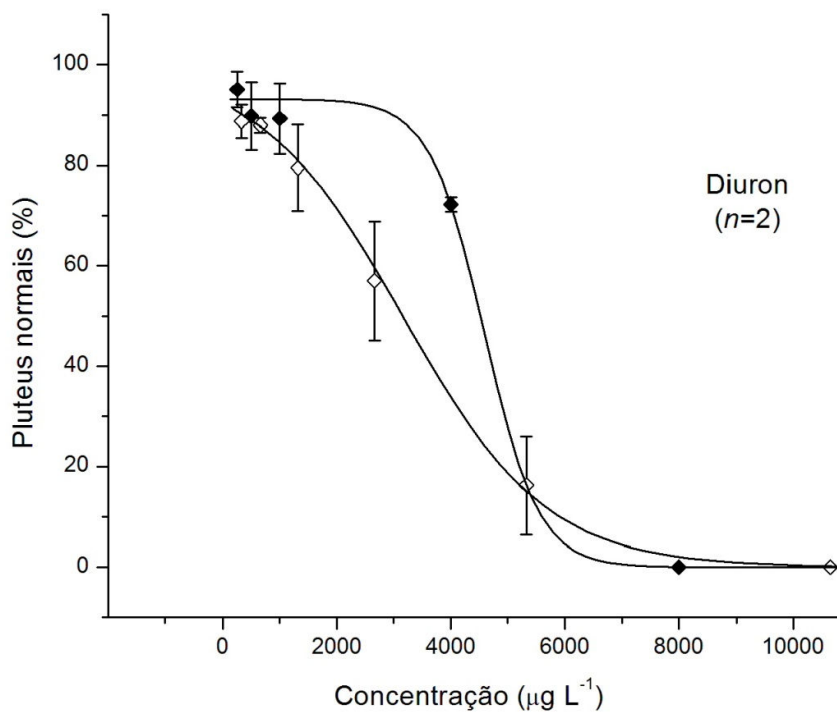


Figura 15: Percentual médio de larvas *pluteus* normais de *Lytechinus variegatus* observados nas diferentes concentrações de Diuron. Os símbolos em branco e preto representam diferentes ensaios. As barras de erros correspondem a desvio padrão.

2.3.2.2 Identificação dos diferentes estágios embrio-larvais

Durante a avaliação dos efeitos sobre o desenvolvimento embrio-larval de *Lytechinus variegatus* foram observados diferentes estágios embrionários nas diferentes concentrações de exposição. Tais observações foram nítidas, principalmente nas concentrações que apresentaram 100% de efeito. Já nas concentrações com efeito inferior a 100%, as anomalias observadas foram de larvas mal-formadas (deformadas) e *pluteus* pequenos. Nas Tabelas 15 e 16 estão apresentados os principais estágios de desenvolvimento embrio-larval de *L. variegatus* observados nas diferentes concentrações de exposição aos compostos anti-incrustantes.

As amostras expostas ao TBT foram as que melhor apresentaram variações do desenvolvimento embrionário em relação ao aumento da concentração. Para este composto, a partir de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$, os organismos começam a apresentar um retardo do desenvolvimento, sendo observadas larvas *pluteus* com tamanho reduzido em aproximadamente 10% do total de larvas observadas. No entanto, a porcentagem de efeito nesta concentração não foi significativamente diferente do Controle ($p > 0,05$). Em concentrações acima de $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de TBT, os embriões foram bloqueados no estágio de gástrula, enquanto que na concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ foram observados alguns indivíduos no estágio de blástula. Já na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, a totalidade dos embriões permaneceu no estágio de mórula (Tabela 15).

Para o TPT, as larvas começaram a apresentar retardo no crescimento a partir de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ após 24 horas da fertilização, porém sem diferença significativa. Na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ também foram observados *pluteus* com tamanho reduzido, porém em maior número, sendo então significativamente diferente em relação ao Controle ($p < 0,01$). A maior concentração que permitiu que os embriões chegassem ao estágio de *pluteus* foi de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que nesta concentração todos os indivíduos apresentaram-se com tamanhos reduzidos ou mal formados. Os embriões não atingiram o estágio de *pluteus* na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, com predominância de embriões na forma de “prisma” (final da gastrulação). Contudo, não foram observados estágios de desenvolvimento anteriores à gastrulação nas concentrações testadas para este composto

Anomalias sobre embriões expostos ao Irgarol 1051 começam a ser visíveis a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, em que os indivíduos apresentam principalmente tamanho reduzido e braços menores que o corpo. Na concentração de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ a deformidade dos *pluteus* é bem nítida, sendo esta a concentração a partir da qual todas as larvas apresentam-se anormais. Em $4000 \mu\text{g L}^{-1}$ foram observados indivíduos mal formados, além dos estágios de gástrula e blástula. Na concentração mais alta testada ($8000 \mu\text{g L}^{-1}$), a maioria das larvas permaneceu no estágio de blástula (Tabela 16).

Nos ensaios com Diuron, não foi observado nenhum indivíduo em estágio anterior ao de *pluteus*, mesmo nas concentrações mais altas. Acima de 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ os efeitos passaram a ser mais acentuados, onde foi observada a redução de tamanho das larvas. O efeito máximo foi observado a 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em que 100% dos indivíduos apresentaram retardamento total no crescimento. Os efeitos no desenvolvimento relacionados a este composto foram principalmente de *pluteus* mal formados ou com comprimento dos braços menores que o resto do corpo (Tabela 16).

Tabela 15: Principais estágios de desenvolvimento embrio-larval de *Lytechinus variegatus* observados nas concentrações de exposição aos compostos organoestânicos.


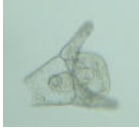



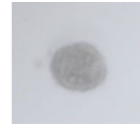




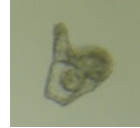





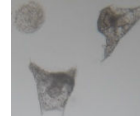






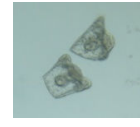
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	0,05	0,25	0,5	1,25	2,5	5
TBT						
TPT						

Tabela 16: Principais estágios de desenvolvimento embrio-larval de *Lytechinus variegatus* observados nas concentrações de exposição aos compostos Irgarol 1051 e Diuron.

	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	250	500	1000	2000	4000	8000
Irgarol						
Diuron						

2.4 DISCUSSÃO

O valor obtido para o sulfato de zinco foi considerado dentro da faixa de variabilidade da espécie, cujos valores reportados por Prósperi (2002) estão entre 0,03 a 0,12 mg L⁻¹ e semelhante ao valor médio de 0,074 mg L⁻¹ encontrado por Nipper *et al.* (1993). Portanto, os resultados dos testes de sensibilidade confirmaram a faixa de sensibilidade estabelecida anteriormente para esta espécie.

Com os ensaios de exposição aos quatro anti-incrustantes foi possível identificar as diferenças de toxicidade entre as duas classes de biocida testadas (organoestânicos e herbicidas). Os resultados obtidos indicaram que o TBT é o composto mais tóxico para os estágios iniciais de desenvolvimento de *L. variegatus*, seguido em ordem decrescente de toxicidade pelo TPT, Irgarol e Diuron sendo este o menos tóxico.

Entre os COEs, o TBT se mostrou mais tóxico que o TPT, com uma resposta muito mais acentuada entre as concentrações. Tanto no ensaio preliminar quanto no definitivo, não foram observadas porcentagens intermediárias do efeito observado, ou seja, entre as concentrações de exposição, quando o efeito não foi de 100%, as médias de cada concentração de exposição não foram significativamente diferentes do Controle ($p > 0,05$). Já para o TPT, foi observado um efeito intermediário onde na concentração de 0,5 µg L⁻¹ apresentou o valor médio entre as réplicas inferior a 80%.

Apesar da variabilidade metodológica entre os experimentos, os níveis de toxicidade observados no presente estudo são consistentes com dados de toxicidade crônica reportados em estudos com outras espécies de ouriço. Bellaset *al.* (2005) obtiveram efeito semelhante com embriões de *Paracentrotus lividus* expostos ao TBT. Nesse estudo os autores reportaram que a inibição total ocorreu a 0,4 µg L⁻¹ após 48 horas de fertilização, enquanto que para *L. variegatus* aqui apresentado foi de 0,5 µg L⁻¹, após 24 horas.

Marin *et al.* (2000) encontraram um padrão semelhante de resposta do desenvolvimento de *P. lividus* após 48h, onde foi possível observar uma redução no tamanho dos *pluteus* nas concentrações entre 0,1 e 0,5 µg L⁻¹. No entanto, os autores relataram que 1 µg L⁻¹ foi a concentração máxima que permitiu aos embriões atingirem o estágio de *pluteus*, enquanto que no presente estudo este estágio só foi atingido em concentrações inferiores a 0,5 µg L⁻¹.

Kobayashi & Okamura (2002), relataram que concentrações em torno de 0,01 µg L⁻¹ de TBTO (forma oxidada de tributilestanho) são suficientes para retardar o desenvolvimento embrio-larval da espécie de ouriço *Anthocardaris crassispina*. Além disso, vários estudos demonstraram que organismos marinhos são afetados por baixas concentrações ambientais de TBT, tais como as deformidades encontradas na ostra *Crassostrea gigas* e no mexilhão

Mitillus edulis expostos a concentrações subletais de TBT (menores que $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$) (Champ, 2000).

Entre o Irgarol 1051 e o Diuron também foram observadas respostas diferentes para as mesmas concentrações de exposição. Neste caso, com o aumento progressivo das concentrações os efeitos do Irgarol foram muito mais acentuados que os do Diuron. No entanto, os efeitos apresentados pelo Diuron começam a ser observados em concentrações mais baixas (ou na mesma faixa de concentração), visto que há uma diferença significativa entre as larvas analisadas na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e as avaliadas no Controle. Adicionalmente, a primeira concentração com 100% de efeito para o Irgarol foi quatro vezes menor que a observada para o Diuron ($2000 \mu\text{g L}^{-1}$ e $8000 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), o que deve ser devido a mecanismos de ação diferentes.

Manzo *et al.* (2006), avaliando a toxicidade crônica destes herbicidas observaram um padrão semelhante. Nesse estudo, a presença de *pluteus* de *P. lividus* com tamanho significativamente menores foram inicialmente observados a $2500 \mu\text{g L}^{-1}$ de Diuron e de $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Irgarol. Porém, a toxicidade deste último foi mais alta quando estimadas pontualmente as concentrações de efeito para 50% dos organismos expostos (2390 para o Diuron e $990 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Irgarol).

Apesar de poucas informações sobre a toxicidade destes compostos, Kobayashi & Okamura (2002), relataram que a toxicidade do Irgarol é cerca de 200 vezes maior para algas do que para os estágios iniciais de desenvolvimento de ouriço. Portanto, em se tratando de espécies animais, os estudos de toxicidade crônica realizados com corais são particularmente interessantes para Irgarol e Diuron. Estes organismos estabelecem uma relação simbiótica mutualística com certas espécies de algas. Dessa forma, o efeito exercido sobre os organismos fotossintetizantes acarreta em dano direto à espécie animal. Jones (2005), em seu estudo com a espécie de coral *Acropora formosa* encontrou uma $CI_{50} - 10h$ de $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol e de $2,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Diuron. Em estudo semelhante com a espécie *Seriatopora hystrix*, Jones *et al.* (2003), concluíram que 50 ng L^{-1} de Irgarol e 200 ng L^{-1} Diuron são suficientes para reduzir a eficiência da fotossíntese da alga simbiótica.

Apesar de não estar prevista na metodologia normatizada (CETESB, 1999; ABNT, 2006), a identificação dos estágios embrio-larvais nos quais os organismos se apresentam em cada concentração de exposição foi de grande utilidade. A análise minuciosa das lâminas, além de oferecer informações a respeito da toxicidade, possibilitou a discriminação da intensidade dos efeitos tóxicos com aumento das concentrações. Adicionalmente, foi possível uma melhor comparação dos efeitos causados pelos compostos dentro de cada classe de biocida.

Embora as $CI_{50} - 24h$ obtidas para TBT e TPT no presente estudo serem relativamente próximas ($0,36$ e $0,77 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), quando comparadas às

mesmas concentrações, foi observado que o TBT interrompeu o desenvolvimento embrião-larval em estágios mais basais que o TPT, o que evidencia uma clara diferença de toxicidade entre os compostos. O mesmo foi verificado para os herbicidas, com bloqueio do desenvolvimento muito mais marcante nas amostras de Irgarol, sendo atribuída uma toxicidade muito superior em relação as mesmas concentrações de Diuron.

Partindo do pressuposto que os embriões precisam capturar o íon cálcio (Ca^{2+}) do meio extracelular para a formação do esqueleto da larva *pluteus*, vários autores têm atribuído à má formação dos embriões à deficiência neste mecanismo frente à exposição ao contaminante. Efeitos reportados do TBT em ascídias e embriões de ouriço incluem a inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria e efeito sobre a homeostase intracelular do Ca^{+2} (Cima *et al.*, 1999; Patricolo *et al.*, 2001; Cima & Ballarin, 2008; Cima *et al.*, 2008).

O primeiro trabalho a esse respeito foi realizado por Girard *et al.* (1997), através da exposição de ovos da espécie de ouriço *Paracentrotus lividus* ao TBT e determinação da tomada de Ca^{2+} pelos embriões durante o período experimental. Dessa forma, os autores demonstraram que baixas concentrações de TBT (atribuíram o valor de 7 μM) afeta a primeira e a segunda clivagem dos ovos durante o desenvolvimento embrionário (Figura 10 a e b), o que inibe a captura intracelular do Ca^{2+} no compartimento reticular. Em contrapartida, verificaram que ao serem expostos a níveis de TBT mais altos que aqueles suficientemente capazes de inibir as divisões iniciais, podem danificar o mecanismo de desenvolvimento embrionário promovendo o ponto de total inibição, levando à inviabilidade das células. Portanto, a interrupção do desenvolvimento embrião-larval em diferentes estágios está relacionada com a interação do TBT na homeostase do Ca^{2+} , o que acarreta em alterações intracelulares dos níveis deste íon.

Com relação aos mecanismos envolvendo o TPT, Moschino & Marin (2002) ressaltam que devido à carência de informações disponíveis na literatura, a ação tóxica deste biocida no desenvolvimento embrionário de invertebrados marinhos não é fácil de explicar. No entanto, estas autoras levantam a hipótese de que o mecanismo de ação do TPT é muito similar ao do TBT. Em seus estudos envolvendo a exposição de embriões de *P. lividus* frente ao TPT, também relataram a ocorrência de diferentes estágios de desenvolvimento em diferentes concentrações, e atribuem à influência do composto na homeostase do cálcio durante o desenvolvimento embrião-larval dos ouriços.

O modo de ação das triazinas (grupo ao qual pertence o Irgarol 1051) sobre invertebrados marinhos não é bem documentado. Porém, Manzo *et al.* (2006) também relataram alterações nos embriões de *P. lividus* expostos a Irgarol. Nesse trabalho foi observada a predominância de larvas mal formadas, cujas alterações estão ligadas aos processos de formação do esqueleto larval. Conforme a teoria apresentada anteriormente, estes autores atribuíram essa má formação à interação do Irgarol 1051 com a homeostase

do cálcio, e alegam que altas concentrações podem modificar a formação do citoesqueleto (danos ocorridos na membrana), enquanto baixas concentrações podem alterar a deposição do esqueleto larval (influxo de cálcio), levando à má formação das larvas.

Altos níveis de TBT já foram reportados na coluna d'água de várias regiões do mundo, conforme apresentadas em recentes trabalhos de revisão: Europa (Langston *et al.*, 2009), EUA (Arai & Harino, 2009) e Ásia (Kannan & Tanabe, 2009). Comparando os níveis apresentados nesses estudos (muitas vezes acima de $1 \mu\text{g L}^{-1}$) com os que produzem efeito sobre os estágios iniciais do ciclo de vida de *L. variegatus* (menor que $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), pode-se concluir que o desenvolvimento destes organismos fica extremamente comprometido em áreas com alta atividade de embarcações.

Embora as tintas a base de COEs terem sido proibidas a alguns anos em muitos países, e banidas pela Organização Marítima Internacional (nos países signatários) há pouco mais de um ano, níveis destes compostos ainda podem ser encontrados no ambiente. Murai *et al.* (2008), encontraram concentrações de TBT na costa do Japão acima de $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$, onze anos após este composto ter sido proibido no país. Esta concentração é suficiente para causar efeitos subletais a diversas espécies de animais marinhos, conforme apresentado neste trabalho.

Os níveis ambientais reportados para os compostos Irgarol e Diuron não são passíveis de apresentar riscos diretos, podendo ser suficientemente importantes quando são levadas em consideração as interações com outros contaminantes. As regiões que se apresentam contaminadas com compostos anti-incrustantes (portos, marinas e estaleiros) são reconhecidamente áreas com alto grau de impactos ambientais. Portanto, interações entre diferentes contaminantes, mesmo estes em concentrações consideradas biologicamente insignificantes quando sozinhos, podem resultar em efeitos tóxicos muito severos, principalmente considerando estágios críticos do ciclo de vida destas espécies (Rand *et al.*, 1995).

Apesar de não terem sido realizados experimentos para avaliar a toxicidade sobre os gametas de *L. variegatus* é possível que os efeitos observados sobre o desenvolvimento larval sejam extrapolados para etapa mais sensíveis da reprodução. Estudos realizados com gametas de outras espécies animais mostraram efeitos adversos em concentrações extremamente baixas dos anti-incrustantes (Moschino & Marin, 2002; Villa *et al.*, 2003; Manzo *et al.*, 2006). Conforme apresentado acima, estes compostos exercem influência sobre o metabolismo de íons Ca^+ e sua participação na fosforilação oxidativa da mitocôndria. Deste modo, concentrações ainda menores podem ser suficientes para comprometer a viabilidade dos espermatozoides do ouriço, uma vez que estas células são totalmente dependentes deste íon. Portanto, o sucesso na fertilização dos ovos de *L. variegatus*, bem

como de outras espécies com fecundação externa, podem ser prejudicados em áreas impactadas.

Em se tratando de avaliação de risco ambiental, ensaios realizados com uma única espécie não são suficientes para determinar o risco exercido pelos compostos, pois apesar de alguns organismos serem afetados, a extensão deste efeito não esta sendo avaliada na sua plenitude. Portanto, deve ser ressaltado que os ensaios crônicos com os embriões de ouriço devem ser considerados como um modelo de sensibilidade da fauna marinha, servindo como um subsídio preliminar à avaliação de risco ecológico, a partir da qual seria possível determinar os limites de segurança. Em linhas gerais, neste tipo de estudo, além de conhecer as propriedades intrínsecas dos compostos, os ensaios devem ser realizados com diferentes grupos organismos e de diferentes níveis tróficos, abrangendo toxicidade crônica, aguda e de bioacumulação (Zagatto, 2006a).

Segundo a resolução CONAMA 357/2005, as concentrações máximas permitidas para tributestanho em águas salinas do Brasil são de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para classe 1 e $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ para classe 2 (CONAMA, 2005). Considerando os resultados com embriões de *L. variegatus*, apesar do seu caráter preliminar, os limites estabelecidos pela resolução são altos o suficiente para inviabilizar o desenvolvimento embrionário deste organismo (já que foi observado 100% de efeito a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Sobretudo, deve ser enfatizado que *L. variegatus* é uma espécie chave para as comunidades de bancos de algas (Böttger & McClintock, 2001), e que reduções nas populações naturais desta espécie podem ser induzidas pelos anti-incrustantes. Assim, alterações na estrutura dessas comunidades podem estar ocorrendo como consequência da exposição aos níveis atuais de COEs, bem como pela ação indireta dos outros biocidas.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM SEDIMENTO

3.1 INTRODUÇÃO

O sedimento pode ser considerado o mais adequado compartimento do ecossistema para indicar efetivamente a qualidade ambiental, dada sua capacidade de acumulação ao longo do tempo e, assim, ser o principal destino de substâncias introduzidas no ambiente (Nipper *et al.*, 1990a). Estudos geoquímicos, no campo ou laboratório, têm mostrado que o sedimento apresenta potencial de formar associações com várias classes de contaminantes (Chapman, 1986) e assim, atuando como um reservatório para estes compostos.

Em relação à sorção do TBT e do TPT ao sedimento, este fenômeno pode ser considerado rápido, porém reversível (Cornelis *et al.*, 2006). Como os COEs têm baixa solubilidade e mobilidade no ambiente aquático, são facilmente adsorvidos ao material particulado em suspensão (Hoch, 2001). A presença de cátions com ligantes carboxilato e fenolato desempenha o papel dominante na complexação do TBT e do TPT com a matéria orgânica (Fent, 2004). Com relação à fração inorgânica, devido às interações hidrofóbicas através do mecanismo de troca catiônica, foi observada em condições de pH baixo a adsorção destes compostos na argila mineral (Marcic *et al.*, 2006).

Em termos de degradação ambiental, no caso específico dos COEs, suas taxas de degradação são substancialmente baixas em sedimento, com meia-vida variando de 1 a 9 anos (Langston *et al.*, 2009). Para ambientes aquáticos, estudos realizados por Clark *et al.* (1988) sugerem que o TBT apresenta rápida degradação na coluna d'água com uma meia vida variando de poucos dias a vários meses. Esta variação depende de fatores como temperatura, incidência de luz, bem como presença de microorganismos capazes de realizar degradação (Dubey & Roy, 2003).

Em função desta baixa taxa de degradação, mesmo vários anos após as restrições quanto ao uso do TBT, as reduções dos níveis nos sedimentos foram consideradas muito baixas e em alguns casos nulas (Becker Van-Slooten & Tarradellas, 1994; Harino & Langston, 2009). Em termos de coluna d'água, apesar desta situação de redução das fontes antrópicas diretas (uso do TBT), a persistência do composto no sedimento e rápida desorção quando estes sedimentos são ressuspensos, fazem do sedimento uma importante fonte de COEs para este compartimento (Clark *et al.*, 1988; De Mora & Pelletier, 1997; Hoch, 2001).

A ressuspensão de sedimentos contaminados pode ocorrer naturalmente, como os observados na zona de turbidez máxima, que ocorrem principalmente em estuários de cunha salina e parcialmente estratificados. Nestes locais são observados altos níveis de sedimentos em suspensão, podendo ser 100 vezes superiores aos de regiões à montante e à jusante (Postoma, 1967). Além disso, durante a dragagem dos canais de navegação em áreas portuárias pode ocorrer um aumento significativo das concentrações de COEs no ambiente aquático sobrejacente, deixando-os biodisponíveis para os organismos de coluna d'água (Hoch, 2001).

No caso do Irgarol 1051, os primeiros estudos indicaram que este composto tem uma baixa afinidade pelo material particulado e, na maioria das águas marinhas, está principalmente associado à fase dissolvida (Tolosa *et al.*, 1996). Porém, outros autores concluíram que o Irgarol 1051 é persistente e pode acumular em áreas onde sua liberação é intensa e com concentrações aquosas altas, promovendo adsorção em material particulado (Thomas *et al.*, 2000).

Já o Diuron tem sido encontrado em elevados níveis em sedimentos, principalmente nas adjacências de marinas e portos, o que tem sido atribuído ao seu uso em tintas anti-incrustantes (Konstantinou & Albanis, 2004). O Diuron tende a adsorver no material particulado adjacente, principalmente quando há elevados teores de carbono orgânico, em função da sua hidrofobicidade (Thomas & Langford, 2009).

Quando estes compostos se agregam às partículas, a deposição deste material, combinada com as baixas taxas de degradação, leva a uma elevação das concentrações em sedimento. O acúmulo destes contaminantes no ambiente sedimentar pode acarretar em sérios riscos aos organismos bentônicos, principalmente para espécies detritívoras e filtradoras. Além disso, a dissolução destes compostos na água intersticial aumenta a biodisponibilidade para organismos da infauna (Fent, 2004).

Os sedimentos apresentam grande importância ecológica, uma vez que servem de substrato para uma grande diversidade de organismos. Dessa forma, quando presentes nos sedimentos contaminados, as espécies bentônicas podem assimilar os contaminantes através da ingestão de partículas ou simplesmente pelo seu contato direto com a superfície corpórea (Power & Chapman, 1992). Portanto, os organismos da infauna estão expostos a concentrações muito maiores do que os organismos nectônicos ou planctônicos (Ueno *et al.*, 2004).

Por outro lado, os diferentes tipos de associações dos contaminantes com os sedimentos podem reduzir a sua biodisponibilidade à biota (Araújo *et al.*, 2006b). Por isso que uma avaliação da contaminação dos sedimentos realizada exclusivamente por análises químicas tem sua importância limitada. Esta abordagem realizada isoladamente apenas quantifica as concentrações presentes no ambiente, não informando quanto a

sua biodisponibilidade e possíveis efeitos à biota. Dessa forma, os ensaios ecotoxicológicos são de extrema importância para avaliar, de forma complementar ou isolada, a qualidade de sedimentos (Chapman & Long, 1983a).

Ensaio ecotoxicológicos têm sido recomendados por agências internacionais de proteção ambiental para o monitoramento das condições de sedimentos marinhos (Chapman & Long, 1983b; Environment Canada, 1998a; ASTM, 2000; USEPA, 2001; ASTM, 2004a; ASTM, 2007; ASTM, 2008a; ASTM, 2008d). No Brasil, apesar dos ensaios ecotoxicológicos serem indicados na avaliação da qualidade das águas (Resolução CONAMA n° 357/05), ainda não existe critérios de qualidade de sedimento, provavelmente pela falta de pesquisas envolvendo ecotoxicologia de sedimentos no país. Somente na Resolução CONAMA 344/04 (CONAMA, 2004), que trata da qualidade dos sedimentos a serem dragados e dos seus rejeitos, os ensaios ecotoxicológicos com sedimentos são recomendados quando os limites químicos forem excedidos.

Nos ensaios de avaliação da toxicidade aguda com sedimento total, normalmente são utilizados organismos naturalmente presentes na infauna, como anfípodos, cumáceos, copépodos, isópodos, bivalves e poliquetos (Burton & Scott, 1992). Entretanto, os anfípodos são os mais difundidos como organismos-teste, pois se apresentam como um grupo muito sensível a diferentes classes de contaminantes, especialmente quando comparados aos poliquetos (Burton & Scott, 1992; Chapman *et al.*, 1997). Estes animais são encontrados em abundância nos ambientes marinhos e estuarinos, com ampla distribuição geográfica. Adicionalmente, devido ao seu tamanho diminuto, são práticos para uso em laboratório, suportando bem o procedimento de coleta, o que possibilita um grande número de réplicas e maior acurácia dos resultados (Environment Canada, 1998a).

Melo (1993) adaptou o ensaio de toxicidade de sedimentos utilizando a espécie de anfípodo *Tiburonella viscana*, a qual é nativa da região sudeste do Brasil. Esta espécie se mostrou adequada após ensaios de sensibilidade a variáveis físico-químicas, substâncias de referência e sedimentos contaminados (Melo & Nipper, 2007), sendo amplamente utilizada em ensaios de toxicidade de sedimentos (Abessa *et al.*, 1998; Abessa, 2002; Abessa & Sousa, 2003; Abessa *et al.*, 2005; Abessa *et al.*, 2006; Cesar *et al.*, 2006).

Ensaio letais e subletais com amostras ambientais, aliados as análises químicas, podem contribuir para avaliação da toxicidade de determinadas substâncias. No entanto, a avaliação da toxicidade de compostos isolados em amostras compostas é muito difícil, devido a gama de fatores interferentes desconhecidos que podem estar presentes e contribuindo para a toxicidade desta amostra. Dessa forma, a utilização de sedimento contaminado (fortificado) em laboratório pode ser uma aproximação adequada

para avaliar a toxicidade de determinados compostos em sedimento (Kukkonen & Landrum, 1998). No entanto, o uso de sedimentos contaminados em laboratório nos ensaios de toxicidade ainda é metodologicamente controverso. Segundo Araújo *et al.* (2006b), esta abordagem não tem se mostrado adequada para o estabelecimento de critérios de qualidade, uma vez que é necessário a realização de um grande número de ensaios com diferentes substâncias (isoladamente ou associadas), organismos e sedimentos. Além disso, não há um procedimento padronizado para adicionar uma ou mais substâncias no sedimento.

A grande limitação dessa abordagem é não levar em consideração as diferentes interações que podem ocorrer no ambiente natural, que dependem das características geoquímicas, biológicas e físicas dos sedimentos. Portanto, não é possível assumir que os resultados dos ensaios fornecem uma medida verdadeira dos efeitos que seriam observados *in situ* (Chapman, 1989).

Segundo Araújo *et al.* (2006), apesar de alguns estudos mostrarem que a toxicidade dos compostos é frequentemente mais alta quando os sedimentos são contaminados em laboratório, a utilização deste método para avaliar a sensibilidade de organismos expostos a substâncias de interesse geralmente é reprodutível. Embora este tipo de procedimento não represente o ambiente de forma satisfatória, é uma ferramenta importante para avaliar a toxicidade de substâncias específicas sobre determinado organismo (Adams *et al.*, 1985). Além disso, esse procedimento permite o estudo do efeito das diferentes características físicas, químicas e biológicas na toxicidade.

Em se tratando do ambiente costeiro brasileiro, ainda não se tem registro de determinações em sedimento dos compostos Irgarol 1051 e Diuron. No entanto, diversos estudos têm reportado a presença de COEs em áreas com intenso fluxo de embarcações (Godoi *et al.*, 2003a; Godoi *et al.*, 2003b; Almeida *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Felizzola *et al.*, 2008).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos compostos utilizados em tintas anti-incrustantes (TBT, TPT, Irgarol 1051 e Diuron) sobre uma espécie que habita a infauna da costa brasileira. Levando em consideração as dificuldades metodológicas supracitadas, porém priorizando a importância dos sedimentos para os compostos avaliados, os ensaios de toxicidade foram conduzidos com sedimentos contaminados em laboratório. Este procedimento buscou avaliar os efeitos agudos destes biocidas isoladamente, sobre anfípodo escavador *Tiburonella viscana*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 ORGANISMO-TESTE

3.2.1.1 *Tiburonella viscana*

Os anfípodos da espécie *Tiburonella viscana* (Thomas & Barnard, 1983), pertencem à subordem Gammaridea, família Platyschnopidae, e apresentam como sinônimo a espécie *Platyschnopus gracilipes* (Wakabara & Serejo, 1998). Estes animais típicos da região sudeste brasileira habitam substratos areno-lodosos em profundidades ente 0 e 65 m, porém sendo encontrados mais comumente na zona entre-marés até 4 m de profundidade. São altamente fotonegativos, enterrando-se imediatamente no sedimento na presença de luz. A noite, deixam o sedimento, e realizam algumas atividades como alimentação, reprodução, muda, dispersão e, também, para evitar condições estressantes do sedimento (Aldredge & King, 1980).

3.2.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ORGANISMOS

Os anfípodos da espécie *Tiburonella viscana* foram coletados no Município de Ilha Bela, litoral Norte de São Paulo, no nível superior do infralitoral da Praia do Engenho D'Água, com auxílio de uma draga especial para coleta de anfípodos, construída segundo modelo usado pela USEPA³. Após o arrasto, a draga foi introduzida em uma caixa de isopor contendo água do mar. Este procedimento faz com que os exemplares de *T. viscana* sejam retidos na superfície da água e, assim, possam ser facilmente capturados com um pequeno puçá de malha fina. Posteriormente, os organismos foram transferidos para frascos de polietileno com volume aproximado de 1,8 L, contendo uma camada de 2 cm de sedimento e água do mar do local. Por fim, os organismos foram transportados para o laboratório, em caixas de isopor.

Em laboratório, os indivíduos de *T. viscana* foram introduzidos em uma bacia contendo água do mar e uma camada de 1 cm de sedimento proveniente do local de coleta, sendo mantidos em temperatura de 25 ± 2 °C, sob iluminação e aeração constantes, por um período de até quatro dias, a fim de minimizar a atividade dos animais. Estes procedimentos são necessários para aclimação dos anfípodos, conforme recomendado pela Environment Canada (1998a).

³ O modelo da draga foi fornecido à CETESB pelo Prof Dr Robert Swartz (USEPA), durante visita técnica ao Brasil

3.2.3 ENSAIOS COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

A sensibilidade do lote de *T. viscana* foi avaliada através de testes de toxicidade com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Este experimento consiste na exposição dos organismos em matriz aquosa por um período de 96 horas. Esta substância é utilizada em procedimento padrão do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da UNESP.

3.2.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM SEDIMENTO CONTAMINADO EM LABORATÓRIO

Diversos procedimentos para fortificação (contaminação) de sedimentos (denominado *Spiking* na língua inglesa) podem ser encontrados na literatura internacional. Entretanto, segundo a *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2008a), apesar de existir uma série de trabalhos apresentando diferentes metodologias, os estudos que realizaram comparações apropriadas entre os métodos são limitados. A agência também ressalta que são necessárias pesquisas adicionais antes de definir uma metodologia padrão. A principal dificuldade em se estabelecer um padrão é que nem sempre um mesmo procedimento pode ser aplicado sobre diferentes espécies de organismos, com diferentes compostos e, sobretudo, em sedimentos com diferentes características físico-químicas.

No presente trabalho, o sedimento utilizado foi coletado em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo. Esta escolha se deve ao fato do sedimento deste local já ter sido utilizado como Controle experimental em estudos pretéritos (Melo, 1993; Abessa, 2002; Perina, 2006; Cesar *et al.*, 2006) e por apresentar uma comunidade bentônica típica de locais não impactados. No mesmo local também foi coletada água com salinidade 34 ± 2 , a qual foi filtrada através de membranas de acetato de celulose (0,45 μ m) e mantida sob aeração suave e à temperatura de 25 °C, até o início do teste. Conforme mencionado anteriormente, a água marinha deste local é isenta de contaminantes e tem sido utilizada como água de diluição em testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* e como água de cultivo para o misídeo *Mysidopsis juniae* pela CETESB (Prósperi, 2002).

3.2.5 PREPARO DO SEDIMENTO PARA POSTERIOR CONTAMINAÇÃO

O sedimento foi peneirado em malha de 300 μ m, utilizando água do local da coleta, a fim de remover os organismos que pudessem ter passado pela triagem de campo. Em seguida foi deixado em repouso por 12 horas para a decantação do

sedimento. Posteriormente, a água foi separada pelo sifonamento da camada sobrenadante, tentando remover o máximo possível de água.

3.2.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO SEDIMENTO

O teor de umidade foi determinado para que fossem calculadas as concentrações das soluções, com base na quantidade de água que já havia no sedimento. Para tanto, foram pesados três béqueres de 150 mL, e anotados os pesos individuais (P_1). Em seguida foram retiradas três sub-amostras de aproximadamente 10 gramas do sedimento e transferidos para os béqueres previamente pesados. Os sistemas sedimentos-béqueres foram pesados em balança de precisão e os valores anotados para os cálculos posteriores (P_2). A secagem das amostras foi conduzida em estufa à 60°C por 4 horas. Após os sistemas terem atingido a temperatura ambiente (deixadas em dessecador por 1 hora), foram novamente pesados (P_3) e calculado o conteúdo de água de cada béquer através da fórmula:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(P_2 - P_1) - (P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)} \cdot (100)$$

O teor de umidade total foi obtido através da média aritmética dos três percentuais de umidade obtidos.

3.2.7 CONTAMINAÇÃO DOS SEDIMENTOS

Devido à falta de uma metodologia nomeadamente como a mais consistente na contaminação de sedimentos para ensaios ecotoxicológicos, foi feita uma adaptação de diferentes métodos descritos na literatura, pois existe uma série de fatores intrínsecos que precisaram ser considerados na tomada dessa decisão. Portanto, foram levadas em consideração as características físico-químicas dos compostos estudados, e as características do sedimento (este por sua vez escolhido devido às características dos organismos utilizados).

Primeiramente foi pesado 600 g de sedimento úmido e introduzido em um béquer de 2 L. Em seguida foi adicionada a solução do contaminante, com uma concentração em que foi considerado o teor de umidade do sedimento, para que a concentração final fosse a desejada (ASTM, 2008a). As concentrações nominais calculadas na presença do sedimento foram de 0,003; 0,03, 0,3; 3 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e TPT e de 3; 30; 300; 3000 e 30000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Irgarol 1051 e Diuron.

Cada mistura (solução + sedimento) foi agitada vigorosamente por 30 minutos com um bastão de vidro. Em seguida o béquer foi coberto com filme plástico e deixado em repouso por 24 horas, para o contaminante entrasse em equilíbrio entre a água intersticial e o sedimento. O tempo de equilíbrio é um dos fatores mais controversos na literatura, e um dos aspectos considerados é o coeficiente de partição octanol-água da substância (K_{ow}). No presente estudo o tempo de repouso foi baseado na publicação de De Witt *et al.* (1992), que definiram o período de 24 horas para o equilíbrio de compostos orgânicos com $K_{ow} < 6$.

Transcorrido o tempo de repouso, o excesso de água sobrenadante foi retirado com uma seringa e cada amostra foi rapidamente homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, os sedimentos contaminados foram distribuídos em béqueres de 1 L, os quais foram utilizados como frascos-teste. Cada béquer recebeu uma camada de aproximadamente 175 mL de sedimento, tendo três réplicas para cada concentração. A água sobrenadante foi retirada completamente de cada béquer com uma seringa. Por fim, 700 mL de água do mar filtrada foram adicionados cuidadosamente, com o auxílio de uma placa de Petri para evitar a ressuspensão do sedimento.

Durante os experimentos foram utilizados dois Controles distintos com três réplicas cada um. O primeiro foi preparado com o sedimento e a água do mar filtrada. No segundo grupo Controle foi adicionada ao sedimento uma solução contendo água de diluição e acetona a 0,05%, cujo percentual representa a máxima concentração que este solvente poderia apresentar nas soluções-teste. O preparo deste sedimento foi conduzido conforme descrito para os compostos anti-incrustantes.

3.2.8 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM O ANFÍPODO *Tiburonella viscana*

A metodologia utilizada para a condução dos testes de toxicidade aguda com fase sólida em sedimentos foi descrita por Melo & Abessa (2002). Os organismos selecionados apresentavam movimentação normal dos apêndices e estavam sem anomalias morfológicas. Complementando a avaliação dos indivíduos, também foi feita uma observação comportamental, pois estes organismos devem responder a estímulos externos contraindo o corpo e, quando colocados em contato com sedimento, devem enterrar-se em até uma hora (Melo, 1993).

Após a preparação dos sistemas, foram introduzidos 10 anfípodos da espécie *T. viscana* previamente identificados como adultos e com a mesma faixa de tamanho em cada réplica. Durante os experimentos os animais não receberam alimentação e permaneceram sob aeração e iluminação constantes e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Nos ensaios não foram utilizadas fêmeas ovígeras, pois sabe-se que o vitelo presente nos

ovos agregaria maior quantidade dos contaminantes (já que as substâncias testadas são lipossolúveis) e, dessa forma, poderia interferir diretamente nos resultados.

Transcorridos 10 dias, o sedimento de cada réplica foi peneirado numa malha de 0,5 mm parcialmente mergulhada em uma bandeja plástica contendo água do mar filtrada. Este procedimento faz com que os indivíduos ficassem expostos na superfície da água, de onde foram retirados com auxílio de uma pipeta *Pasteur* e transferidos para placas de Petri. Em seguida, cada organismo foi examinado sob estereomicroscópio, para melhor avaliação.

A mortalidade foi quantificada, sendo considerados mortos os anfípodos que não apresentaram movimento dos apêndices, nem contrações no tubo digestivo. Quando a soma final dos organismos (vivos e/ou mortos) em determinada réplica não atingiu 10, os organismos não encontrados foram considerados mortos.

Periodicamente, foram verificados os parâmetros físico-químicos da água sobrenadante em cada réplica. Para determinar a concentração de oxigênio dissolvido foi utilizado um oxímetro, a temperatura e pH foram determinados com o uso de pHmetro digital com termômetro, e a salinidade foi verificada com auxílio de um refratômetro.

3.2.9 ANÁLISES SEDIMENTOLÓGICAS

3.2.9.1 Teor de carbonato total

Para estimar o teor de carbonatos presente no sedimento, foi seguido o método descrito por Gross (1971). A amostra foi seca em estufa a 60°C por 3 dias. Em seguida, uma fração de 30 gramas foi pesada, separada e transferida para recipientes plásticos contendo 60 mL de ácido clorídrico a 10% por 2 dias, para eliminação dos carbonatos. Em seguida, a amostra é retida em papel filtro previamente pesado, lavada com água destilada e, após seca em estufa a 60°C por 2 dias, novamente pesada. A diferença entre o peso final e inicial forneceu a estimativa do teor de carbonatos.

3.2.9.2 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi feita seguindo o método de peneiramento descrito por Suguio (1973). Uma fração de 25 g da amostra foi seca em estufa a 60°C por 2 dias. Em seguida, o material foi peneirado por 10 minutos em agitador *RO-TAP*, utilizando-se jogo de peneiras "*granutest*", as quais apresentavam diferentes malhas seguindo os intervalos >2 mm; 1 mm; 0,5 mm; 0,25 mm; 0,125 mm; 0,063 mm e < 0,063 mm. A massa das frações granulométricas retidas em cada peneira foi quantificada em balanças digital e analítica. Para determinar a distribuição granulométrica foi empregada a escala de

Wentworth, na qual as frações foram classificadas de acordo com as categorias: areia grossa (fração > 0,5 mm), areia média (fração > 0,25 mm), areia fina (>0,125 mm), areia muito fina (> 63 μm) e silte/argila (< 63 μm).

3.2.9.3 Quantificação de matéria orgânica

Foram preparadas 5 sub-amostras do sedimento coletado para a quantificação da matéria orgânica, sendo que para cada uma foi transferido 5 g do sedimento para cadinhos de porcelana e pesados em balança-analítica. Foi anotado o valor das pesagens de cada sistema cadinho-sedimento e levados a um forno mufla, onde a amostra foi incinerada a 600°C por 2 horas. Em seguida, foram aguardadas algumas horas para que os sistemas atingissem a temperatura ambiente, sendo novamente pesados. O cálculo do percentual de matéria orgânica foi feito através da diferença entre as médias das pesagens iniciais e finais.

3.2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Ao final de cada ensaio foi verificado se havia diferença significativa entre as médias de sobrevivência obtidas nos Controles (água de diluição e acetona). Para tanto foi utilizado o teste *t*-student (através do programa *STATISTICA vers. 6.0*). Dessa forma foi possível verificar se o solvente poderia exercer efeito sobre o resultado.

Os valores das concentrações letais medianas a 50% dos organismos expostos, após 10 dias de exposição CL₅₀ – 10d e os intervalos de confiança (95%), foram calculados pelo método *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton *et al.*, 1977).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 CRITÉRIOS DE ACEITABILIDADE DOS ENSAIOS

3.3.1.1 Controle negativo

A porcentagem média de sobrevivência de *Tiburonella viscana* nos Controles experimentais foi superior a 80%. Este percentual foi observado tanto para a solução contendo acetona (0,05%), quanto para as réplicas apenas com água de diluição (água do mar filtrada) (Figura 17). Através do teste *t-Student* foi verificado que a média entre estes dois tratamentos não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Portanto, nos cálculos das CL50 – 10d optou-se pelo agrupamento de ambos em um único grupo Controle.

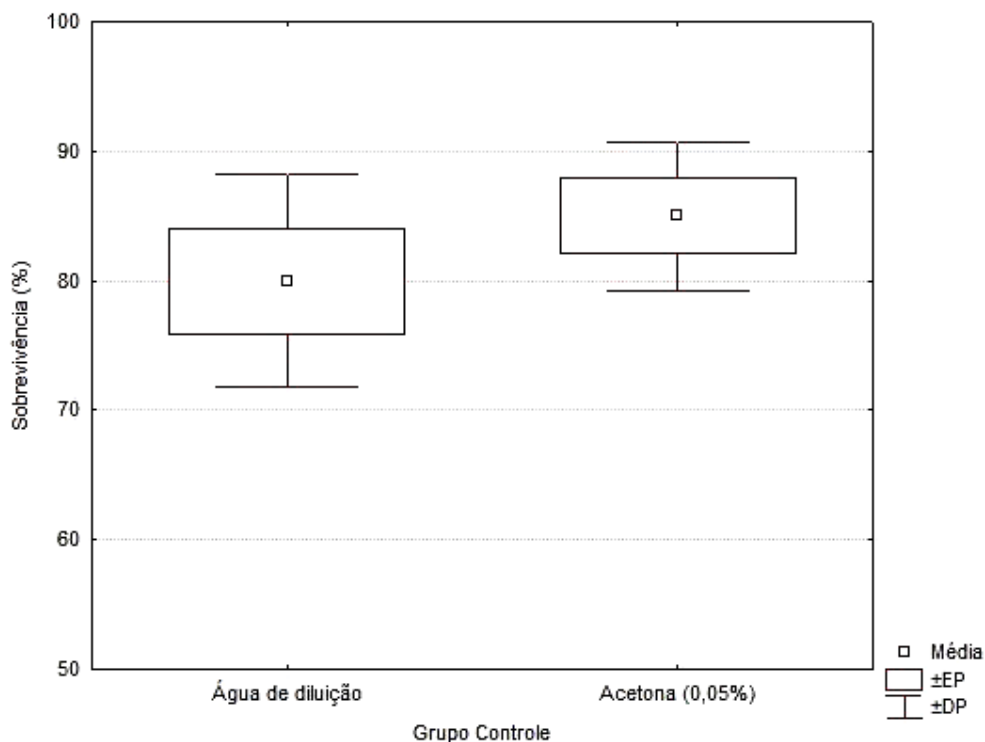


Figura 16: Percentual médio de sobrevivência entre os dois Controles experimentais utilizados nos ensaios com *Tiburonella viscana*. EP e DP correspondem ao erro padrão e desvio padrão, respectivamente.

3.3.1.2 Ensaios com substância de referência

A CL₅₀ - 96h estimada para o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) foi de 9,22 mg L⁻¹, com intervalo de confiança (95%) de 7,3 - 11,7 mg L⁻¹. Este valor foi considerado dentro da faixa aceitável para a espécie, cuja variação pode estar entre 3,68 e 18,75 mg L⁻¹ (Abessa & Sousa, 2003). Portanto, a sensibilidade do lote de organismos testado foi considerada adequada para os ensaios subsequentes.

3.3.2 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS ANTI-INCRUSTANTES

Foram realizados dois ensaios com cada composto anti-incrustante para avaliar a toxicidade dos sedimentos contaminados frente à espécie *T. viscana*. Dos experimentos realizados, o primeiro foi considerado preliminar e o segundo como definitivo. As CL₅₀ -10d obtidas estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados das CL₅₀ – 10d para *Tiburonella viscana* calculadas com base nas concentrações nominais dos compostos anti-incrustantes em sedimento.

Ensaio	TBT (µg g ⁻¹)		TPT (µg g ⁻¹)		Irgarol (µg g ⁻¹)		Diuron (µg g ⁻¹)	
	CL ₅₀	(±IC - 95%)	CL ₅₀	(±IC - 95%)	CL ₅₀	(±IC - 95%)	CL ₅₀	(±IC - 95%)
Preliminar	0,70	(0,09 – 5,45)	0,44	(0,10 - 1,98)	228	(NC)	3480	(825 – 14709)
Definitivo	1,69	(0,63 - 4,57)	1,22	(0,25 - 5,90)	173	(87 – 344)	2885	(934 - 8914)

NC=não calculado

3.3.3 VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ENSAIOS

Os dados obtidos não mostraram variações significantes dos parâmetros físico-químicos, permanecendo dentro dos níveis aceitáveis para garantir a qualidade do ensaio. Segundo Melo & Abessa (2002), os critérios estabelecidos para aceitabilidade de testes com *T. viscana* são: pH maior que 7,0; salinidade entre 30 e 36, oxigênio dissolvido acima de 3 mg/L; teor de nitrogênio amoniacal abaixo de 10 mg L⁻¹ e temperatura em torno de 25 (± 2) °C. Valores anormais destes parâmetros poderiam resultar em mortalidade dos anfípodos e levar a conclusões errôneas acerca dos níveis de toxicidade da cada concentração.

3.3.4 ANÁLISES SEDIMENTOLÓGICAS

Os parâmetros obtidos com as análises sedimentológicas foram os seguintes: 3,7% de areia média; 29,2% de areia fina; 48,5% de areia muito fina e 18,4% de silte/argila. O teor de carbonato (CaCO₃) total foi de 23,7%, enquanto que a quantidade de matéria orgânica obtida através da análise foi de 0,8%.

DISCUSSÃO

A toxicidade de compostos orgânicos não iônicos em diferentes sedimentos tem sido relacionada com o conteúdo de carbono orgânico presente nos mesmos. Isso ocorre porque a partição desses compostos entre o sedimento e a água é influenciada principalmente pelo conteúdo de matéria orgânica (Burguess & Scott, 1992). Além disso, está bem documentado na literatura que carbono orgânico exerce efeito na acumulação de TBT em sedimento e que a granulometria pode ser um importante fator na biodisponibilidade deste composto para os invertebrados da infauna.

Embora tenham sido realizadas as análises de teor de carbonato total, análise granulométrica e quantificação de matéria orgânica, não foi possível estabelecer uma relação entre estes parâmetros e a toxicidade apresentada. Deste modo, seria necessário realizar novos ensaios e avaliar as possíveis variações em função destes parâmetros. No entanto, as limitações apresentadas são atribuídas ao pioneirismo deste tipo abordagem, sobretudo pela ausência de estudos na literatura, que permitissem uma análise comparativa.

A falta de padronização de um método consistente para realizar a contaminação das matrizes sedimentares de forma eficaz é uma preocupação adicional. Porém, este trabalho pode ser considerado o primeiro passo no desenvolvimento de estudos para avaliar a toxicidade dos compostos anti-incrustantes sobre espécies da infauna, principalmente para organismos nativos da costa brasileira.

As informações sobre o destino dos compostos anti-incrustantes no ambiente aquático são essenciais para uma avaliação ambiental. Vários estudos reportaram altas concentrações de COEs em sedimentos próximos a portos e marinas em níveis significativamente relevantes para causar danos à biota. Em alguns países, após alguns anos das restrições quanto ao uso do TBT terem sido decretadas, as reduções de concentrações nos sedimentos foram consideradas muito baixas e em alguns casos nulas (Becker Van-Slooten & Tarradellas, 1994). Estes níveis são atribuídos à substancial persistência deste composto em sedimentos (Marcic *et al.*, 2006).

Os trabalhos realizados no Brasil mostraram que as concentrações de COEs em sedimentos marinhos superficiais são extremamente altas e estes níveis representam sérios riscos para as populações naturais dos organismos testados. Para o TBT a CL₅₀-10d obtida foi de 1,69 µg g⁻¹ de sedimento (peso seco), muito próximo dos valores reportados em sedimentos da Baixada Santista (litoral de São Paulo), onde variaram de 0,033 a 1,4 µg g⁻¹ (Godoi *et al.*, 2003a; Godoi *et al.*, 2003b).

Outros estudos realizados no Brasil apresentaram valores menores, porém alarmantes, já que no ambiente natural os sedimentos apresentam variações nos parâmetros físico-químicos que podem ocasionar efeitos tóxicos diferentes (Prósperi, 2002). Na Baía de Guanabara também foram identificaram sedimentos contaminados com COEs. Almeida *et al.* (2004) encontraram concentrações de TBT entre 0,005 e 0,27 $\mu\text{g g}^{-1}$. Já os valores reportados por Fernandez *et al.* (2005) variaram de 0,001 a 0,52 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o TBT e de 0,004 a 0,04 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o TPT. Na Baía de Todos os Santos (Bahia), Felizzola *et al.* (2008) detectaram a concentração de 0,0054 $\mu\text{g g}^{-1}$ de TBT em sedimentos superficiais.

Altos níveis de Irgarol e Diuron têm sido reportados em sedimentos de áreas portuárias de diversas regiões do mundo, principalmente na Ásia e Europa. No entanto, até mesmos os mais altos níveis de Irgarol (em torno de 0,43 $\mu\text{g g}^{-1}$) e de Diuron (1,3 $\mu\text{g g}^{-1}$), ambos de áreas portuárias do Japão (Harino *et al.*, 2009), são muito inferiores as CL50 - 10d determinadas para *T. viscana* (174 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Irgarol e 2886 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Diuron). Na Europa, os maiores níveis de Irgarol encontrados foram em sedimentos do Mar Báltico chegando a 0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Voulvoulis *et al.*, 2000), enquanto que para o Diuron, os maiores níveis foram encontrados em sedimentos do estuário de Hamble (Grã-Bretanha), variando de <0,1 a 1,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Comber *et al.*, 2002). Até o momento não foram encontrados registros sobre concentrações ambientais de Irgarol e Diuron em sedimentos marinhos e/ou estuarinos da costa brasileira (atribuídos exclusivamente ao uso destes compostos como anti-incrustantes).

Segundo Meador *et al.* (1997), para os compostos estudados a, principal característica determinante de seu comportamento é o conteúdo de matéria orgânica associada ao sedimento e à água intersticial. Em estudo de bioacumulação, estes autores observaram uma maior concentração de TBT no tecido de várias espécies de invertebrados, quando expostos a sedimentos com maior quantidade de carbono orgânico total. Outros estudos mostraram resultados semelhantes para outros compostos orgânicos (Adams *et al.*, 1985; Nebeker *et al.*, 1989). É importante ressaltar que os invertebrados bentônicos selecionam como alimento partículas com alta concentração de matéria orgânica, que podem conter elevadas concentrações de contaminante ao qual o organismo está exposto (Araújo *et al.*, 2006b).

Segundo Voparil & Mayer (2006a), a ingestão de sedimento contaminado pode ser a principal rota de assimilação de contaminantes. Assim, o hábito alimentar, incluindo o tipo e a taxa de alimentação pode modular a entrada de contaminantes orgânicos no interior dos organismos. Esta relação foi demonstrada por Langston & Burt (1991), através de experimentos de exposição do molusco *Scrobicularia plana* em amostras contaminadas com TBT na presença e ausência de sedimento (TBT + água de diluição).

Os efeitos observados sobre o animal foram maiores nas amostras que continham sedimento, mesmo estas tendo sido preparadas com menores concentrações de TBT. A maior toxicidade foi atribuída ao hábito detritívoro dessa espécie, ou seja, através da ingestão de partículas contaminadas.

Neste contexto, a maior sensibilidade observada para espécie *T. viscana* em comparação com dados de toxicidade aguda em fase aquosa apresentados no Capítulo 1 deste trabalho (*Acartia tonsa*, *Mysidopsis juniae* e *Kalliapseudes schubartii*), pode ter sido influenciada pela ingestão dos compostos que estavam ligados à matéria orgânica. Deste modo, além da assimilação através da superfície corpórea, uma importante rota de captação e absorção de COEs pode ter sido via injeção seja na forma particulada como dissolvida na água intersticial.

Nebeker *et al.* (1989) investigando a influência do carbono orgânico na biodisponibilidade dos compostos orgânicos DDT e Endrin para *Hyalella azteca*, verificaram que a toxicidade diminuiu com o aumento de concentração de carbono orgânico total na matriz sedimentar. No entanto, não foi observada diferença significativa, na toxicidade da água intersticial entre o valor mais alto e mais baixo carbono orgânico avaliado em fase aquosa. No caso do Endrin, não foi observada correlação direta entre toxicidade e concentração de carbono orgânico total do sedimento. Esses dados mostraram que o DDT parece se comportar de acordo com a teoria do equilíbrio de partição, mas não o Endrin. Portanto, a afirmação de que o conteúdo orgânico regula a toxicidade de substâncias orgânicas (através da disponibilidade para assimilação que pode levar ao efeito) parece depender das propriedades do contaminante, não sendo válida para todas as substâncias apolares. Assim, é plausível que sejam encontrados diferentes padrões de toxicidade nos experimentos em sedimentos.

A literatura não apresenta informações sobre ensaios utilizando estes compostos em sedimento contaminado em laboratório. Dessa forma, tomando como base as informações apresentadas na literatura para ensaios com matrizes aquosas e os dados obtidos no Capítulo 1 deste trabalho, era esperado que a CL50 calculada para o TPT fosse maior que a do TBT. Entretanto, foi observada uma maior toxicidade do TPT, que pode estar relacionada com a biodisponibilidade. Talvez este composto estivesse presente em maior concentração que o TBT na água intersticial, amplificando as vias de assimilação.

Segundo Marcic *et al.* (2006), o TPT apresenta grande mobilidade na interface sólido/líquido, podendo ser desorvido mais facilmente que o TBT. Nesse estudo os autores realizaram experimentos que visavam simular o processo de lixiviação sofrido por estes compostos. A constatação inicial foi que 90% da concentração total de TPT adicionado ao sedimento foi adsorvida neste compartimento após um período de

aproximadamente 12 horas, em que as amostras foram mantidas em repouso para atingir o equilíbrio entre as matrizes. Entretanto, estes compostos foram facilmente carregados durante os testes de lixiviação, diferente do observado para o TBT. Ao final de 2 meses o sedimento fortificado com TPT apresentava menos de 20% da concentração inicialmente adsorvida, enquanto que nas amostras com TBT mais de 50% da concentração inicial permaneceu no sedimento.

O mesmo processo pode estar relacionado com a toxicidade muito mais acentuada do Irgarol em relação ao Diuron. Nos ensaios em fase aquosa (ver Capítulo 1), as CL₅₀ calculadas não apresentaram grandes diferenças e muitas vezes com sobreposição dos intervalos de confiança. No entanto, sobre os anfípodos, a toxicidade do Irgarol foi uma ordem de magnitude superior em relação ao Diuron, o que pode estar relacionado com a maior disponibilidade deste composto na água intersticial.

Segundo Voulvoulis (2006), após o Irgarol ser adsorvido ao sedimento, o processo é facilmente reversível e, quando liberado nas águas adjacentes pode atingir concentrações significativas, principalmente em se tratando de água intersticial. Nesse estudo foi reportado que a taxa de liberação medida do sedimento para a coluna d'água adjacente foi de 2,4% e, segundo os autores, embora este percentual possa parecer baixo, nas condições em que foram realizados os experimentos, o processo de dessorção resultaria numa concentração de 5,84 mg L⁻¹ de Irgarol na coluna d'água adjacente. No mesmo estudo, o Diuron mostrou um comportamento diferente, onde foi observada uma menor taxa de liberação desta substância. Dessa forma, os autores concluíram que a adsorção do Diuron não é facilmente reversível.

Em geral, o processo de dessorção é dependente do grau de perturbação do sedimento. A bioturbação realizada pelos anfípodos, embora considerada desprezível em escala maior, poderia facilmente promover este processo pontualmente. Deste modo, durante os ensaios de toxicidade, pode ter ocorrido uma efetiva re-disponibilização do TPT e do Irgarol para o meio adjacente e, assim, a captação do contaminante pelo organismo ter ocorrido também via água. Os compostos apolares se ligam preferencialmente ao carbono orgânico, mas podem existir níveis significativos de contaminantes na água, principalmente com matéria orgânica dissolvida. Neste caso, uma das principais formas de exposição dos organismos pode ser preferencialmente através da água intersticial (Power & Chapman, 1992). Dessa forma, o efeito para os organismos bentônicos pode ser influenciado diretamente pela presença dos compostos nesta fase, através da captação via superfície corpórea e tecidos respiratórios, e não apenas pela alimentação.

V. CONCLUSÕES

Nos ensaios com matrizes aquosas, os efeitos agudos e crônicos apresentados pelos biocidas mostraram o mesmo padrão de toxicidade sobre todos os organismos testados: TBT > TPT > Irgarol 1051 > Diuron. Assim, merecem destaque os compostos orgânicos de estanho, os quais apresentaram os maiores níveis de toxicidade quando comparados aos novos agente anti-incrustantes, principalmente em se tratando de efeitos crônicos, onde as concentrações de efeito foram de mil a dez mil vezes maiores entre as classes de biocidas.

Em sedimento, a toxicidade aguda do TPT foi maior dentre os anti-incrustantes estudados, embora não seja significativamente diferente dos níveis apresentados pelo TBT. Esta resposta foi atribuída à maior facilidade com que o TPT pode ser desorvido das partículas sedimentares, e assim ficar biodisponível na água intersticial. O mesmo comportamento pode explicar também a maior toxicidade do Irgarol frente ao Diuron para a espécie *T. viscana*.

Em relação à sensibilidade dos organismos estudados, nos ensaios de toxicidade aguda em matrizes aquosas as espécies genuinamente pelágicas, como o copépodo *A. tonsa* e o misídeo *M. juniae*, se mostraram altamente sensíveis aos COEs. Por outro lado, para que o efeito letal fosse evidenciado no tanaidáceo *K. schubartii* são necessárias concentrações superiores às encontradas no ambiente aquático até o momento.

A espécie *T. viscana* mostrou-se altamente sensível aos COEs, quando exposta aos sedimentos contaminados (fortificados). As CL₅₀ – 10d obtidas para os anfípodos estão abaixo dos níveis ambientais encontrados por outros estudos em amostras de sedimento. Os níveis de TBT em sedimentos da costa brasileira apresentam valores equivalentes à concentração letal calculada, o que sugere comprometimento ecológico dessas áreas.

Os efeitos observados nos ensaios crônicos mostraram que os níveis ambientais dos anti-incrustantes podem afetar as populações naturais da espécie *L. variegatus*. Concentrações dez vezes abaixo das CL₅₀ para as espécies planctônicas testadas são suficientes para causar efeito sobre os estágios iniciais de desenvolvimento dos ouriços. Adicionalmente, a identificação de tais estágios mostrou-se uma ferramenta de grande utilidade para a discriminação dos níveis de toxicidade nas diferentes concentrações, permitindo uma melhor comparação dos efeitos causados pelos compostos dentro de cada classe de biocidas.

Os organismos testados mostraram-se adequados para avaliar a segurança do uso de compostos anti-incrustantes na costa brasileira. Os resultados dos ensaios

subletais com ouriço indicam que a concentração máxima permitida pela resolução do CONAMA 357/2005 para águas salinas da Classe 2 ($0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ para o TBT) é suficiente para inviabilizar o desenvolvimento embrionário desta espécie (100% de efeito à $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Deste modo, destaca-se a importância de avaliar a toxicidade dos contaminantes sobre espécies nativas, como subsídios para a inclusão de limites seguros nas legislações ambientais.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

As atividades realizadas neste trabalho serão complementadas através das determinações químicas das concentrações em que os organismos foram expostos nos ensaios de toxicidade. Deste modo, os materiais previamente processados ao final dos experimentos serão analisados por cromatografia de fase gasosa com espectrômetro de massas (GC/MS).

Uma nova bateria de ensaios com a espécie *Mysidopsis juniae* será conduzida com o intuito de obter um n amostral mais amplo, e conseqüentemente, resultados mais robustos.

Visto que é indispensável a realização de ensaios de toxicidade com sedimento, pois os agentes anti-incrustantes são representativos neste compartimento, um método de fortificação deverá ser testado e validado. Além disso, serão realizados ensaios comparativos utilizando espécies de sedimento (*Tiburonella viscana* e *K. schubartii*), a fim de avaliar de forma comparativa a sua sensibilidade, definindo assim o melhor organismo-teste para estudos ecotoxicológicos nesta matriz.

Adicionalmente, pretende-se realizar os ensaios de toxicidade em sedimentos com diferentes características físico-químicas. Embora não seja possível controlar todas as variáveis que podem exercer influência na sorção e degradação dos compostos estudados, pretende-se avaliar inicialmente o efeito da granulometria e teor de matéria orgânica na toxicidade dos compostos, pois esses parâmetros podem atuar diretamente na biodisponibilidade do contaminante.

A realização de ensaios de toxicidade com espécies de níveis tróficos e grupos taxonômicos diferentes poderá fornecer um melhor significado ecológico dos compostos testados, bem como avaliações de efeitos fisiológicos e comportamentais. Além disso, a utilização de espécies fotossintetizantes pode mostrar padrões de toxicidade diferentes, principalmente em relação aos herbicidas (Irgarol 1051 e Diuron).

Novos ensaios crônicos, utilizando faixas de concentração mais restritas, poderão ser adequados para uma melhor análise dos efeitos sobre o desenvolvimento embrio-larval de ouriços, através da avaliação visual adotada neste trabalho.

Outro aspecto de extrema relevância é avaliar a toxicidade destes compostos em conjunto, através da exposição dos organismos em misturas contendo dois ou mais biocida, bem como na presença de metais que podem ser encontrados nas formulações (neste caso para os herbicidas Irgarol 1051 e Diuron).

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abessa, D. M. S. (2002). Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos. Tese de Doutorado, Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 290 p.
- Abessa, D.M.S. & Sousa, E.C.P.M. (2003). Sensitivity of Amphipod *Tiburonella viscana* (Platyischnopidae) to $K_2Cr_2O_7$. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **46**, 53-55.
- Abessa, D.M.S.; Sousa, E.C.P.M.; Rachid, B.R.F. & Mastroi, R.R. (1998). Use of the burrowing Amphipod *Tiburonella viscana* as tool in Marine Sediments Contaminant Assessment - Marine Sediments Contaminant Assessment. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **41**, 225-230.
- Abessa, D.M.S.; Sousa, E.C.P.M. & Tommasi, L.R. (2006). Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Revista de Geologia* **19**, 253-261.
- Abessa, D.M.S.; Zaroni, L.P.; Souza, C.P.; Gasparrol, M.R.; Pereira, C.D.S.; Rachid, B.R.F.; Depledge, M.H. & King, R.S. (2005). Physiological and cellular responses in two populations of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**, 217-225.
- ABNT (2004). Norma ABNT-NBR 12713:2004, Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda - "Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)". *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, Rio de Janeiro, 21 p.
- ABNT (2005a). Norma ABNT-NBR15308:2005, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - "Método de ensaio com Misidáceos (Crustacea)". *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, Rio de Janeiro, 17 p.
- ABNT (2005b). Norma ABNT-NBR13343:2005, Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Crônica - "Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Cladocera, Crustacea)". *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, Rio de Janeiro, 19 p.
- ABNT (2005c). Norma ABNT-NBR 12648:2005, Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Crônica - "Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)". *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, Rio de Janeiro, 24 p.
- ABNT (2006). Norma ABNT-NBR:15350:2006, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - "Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)". *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, Rio de Janeiro, 14 p.
- Abou-setta, M.M.; Sorrell, R.W. & Childers, C.C. (1986). A Computer-Program in Basic for Determining Probit and Log-Probit Or Logit Correlation for Toxicology and Biology. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **36**, 242-249.

- Adams, W.J.; Kimerle, R.A. & Mosher, R.G. (1985). Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. In: Cardwell, R. D.; Purdy, R. & Bahner, R. C. (eds.), *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium. American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, PA. pp. 429-453.
- Albalat, A.; Potrykus, J.; Pempkowiak, J. & Porte, C. (2002). Assessment of organotin pollution along the Polish coast (Baltic Sea) by using mussels and fish as sentinel organisms. *Chemosphere* **47**, 171.
- Allredge, A.L. & King, J.M. (1980). Effects of moonlight on the vertical migration patterns of demersal zooplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **44**, 133-156.
- Almeida, A.C.; Wagener, A.D.R.; Maia, C.B. & Miekeley, N. (2004). Speciation of organotin compounds in sediment cores from Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Applied Organometallic Chemistry* **18**, 694-704.
- Almeida, E.; Diamantino, T.C. & Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* **59**, 2-20.
- Alzieu, C. (2000a). Environmental impact of TBT: the French experience. *The Science of the Total Environment* **258**, 99-102.
- Alzieu, C. (2000b). Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* **9**, 71-76.
- Alzieu, C.; Heral, M.; Thibaud, Y.; Dardignac, M. & Feuillet, M. (1982). Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Rev. Inst. Pêches Maritime* **45**, 101-116.
- Alzieu, C.L.; Sanjuan, J.; Deltreil, J.P. & Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin* **17**, 494-498.
- Alzieu, C. (1991). Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research* **32**, 7-17.
- Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management* **40**, 23-36.
- Andersen, H.R.; Halling-Sorensen, B. & Kusk, K.O. (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 56-61.
- APHA (1998). 20th edition, Standard Methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation*, Washington, D.C,
- Aragão, M.A. & Araújo, R.P.A. (2006). Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. Rima*, São Carlos. pp. 117-152.

- Arai, T. & Harino, H. (2009). Contamination by Organotin Compounds in Asia. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo - Japan. pp. 61-74.
- Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (2009). *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo - Japan. 425 p.
- Araújo, M.M.S. & Nascimento, I.A. (1999). Testes ecotoxicológicos marinhos: análise de sensibilidade. *Ecotoxicology and Environmental Restora.* **2**, 41-47.
- Araújo, R.P.A.; Shimizu, G.Y.; Bohrer, M.B.C. & Jardim, W. (2006a). Avaliação da Qualidade de Sedimentos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos. pp. 293-326.
- Araújo, R.P.A.; Shimizu, G.Y.; Bohrer, M.B.C. & Jardim, W. (2006b). Avaliação da Qualidade de Sedimentos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos. pp. 293-326.
- Asmus, M. L. (1984b). Estrutura da comunidade associada a *Ruppia maritima* no Estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS. 154 p.
- Asmus, M. L. (1984a). Estrutura da comunidade associada a *Ruppia maritima* no Estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS. 154 p.
- ASTM (1992). Standard E1463:1992, Standard Guide for "Conducting static and flow-through acute toxicity tests with mysids from the west coast of the United States". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 1238 p.
- ASTM (2000). Standard E 1706:2000, Standard Test Method for "Measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 117 p.
- ASTM (2004a). Standard E 2317:2004, Standard Guide for "Conducting Renewal Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 16 p.
- ASTM (2004b). Standard E 724 - 98:2004, Standard Guide for "Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 21 p.
- ASTM (2004c). Standard E 1563:1995 (2004), Standard guide for "Conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 20 p.
- ASTM (2004d). Standard E 1218:2004, Standard Guide for "Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 14 p.

- ASTM (2006). Standard E 1562 - 00:2006, Standard Guide for "Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with Polychaetous Annelids". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 21 p.
- ASTM (2007). Standard E 1023 - 84:2007, Standard Guide for "Assessing the Hazard of a Material to Aquatic Organisms and Their Uses". *ASTM International*, West Conshohocken, PA,
- ASTM (2008a). Standard E 1391 - 03:2008, Standard Guide for "Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for Selection of Samplers Used to Collect Benthic Invertebrates". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 94 p.
- ASTM (2008b). Standard E 1191 - 03a:2008, Standard Guide for "Conducting Life-Cycle Toxicity Tests with Saltwater Mysids". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 17 p.
- ASTM (2008c). Standard 1847 - 96:2008, Standard Practice for "Statistical Analysis of Toxicity Tests Conducted Under ASTM Guidelines". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 9 p.
- ASTM (2008d). Standard E 1367 - 03:2008, Standard Test Method for "Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates". *ASTM International*, West Conshohocken, PA, 62 p.
- Azevedo, D.; Gerchon, E. & Reis, E.O. (2004). Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **15**, 292-299.
- Badaró-Pedroso, C. (1999). Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 249 p.
- Badaró-Pedroso, C.; Reynier, M.V. & Prósperi, V.A. (2002). Testes de Toxicidade Aguda com Misidáceos - Ênfase nas Espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea). In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. (eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. *Comp & Art*, Salvador - BA. pp. 123-139.
- Barnes, R. (1996). Zoologia dos Invertebrados. 6ª edição. *Roca*, São Paulo. 1028 p.
- Basheer, C.; Tan, K.S. & Lee, H.K. (2002). Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 697-703.
- Becker Van-Slooten, K. & Tarradellas, J. (1994). Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**, 755-762.
- Bellas, J.; Beiras, R.; Marino-Balsa, J. & Fernandez, N. (2005). Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: A comparison between the

- sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* **14**, 337-353.
- Bertoletti, E. (1990). Estimativa da carga tóxica de efluentes industriais. *Ambiente* **4**, 54-61.
- Bianchini, A.; Martins, S.E.G. & Barcarolli, I.F. (2004). Mechanism of acute copper toxicity in euryhaline crustaceans: implications for the Biotic Ligand Model. *International Congress Series* **1275**, 189-194.
- Birge, W.J.; Black, J.A. & Westerman, A.G. (1985). Short-term fish and amphibians test for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* **49**, 807-821.
- Blunden, S.J.; Hill, R. & Sutton, S.E. (1991). A Thermal Analytical Study of Some Mono-Organotin and Di-Organotin Oxides and Carboxylates. *Applied Organometallic Chemistry* **5**, 159-165.
- Böttger, S.A. & McClintock, J.B. (2001). The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology* **129**, 307-315.
- Boxall, A.B.A.; Comber, S.D.; Conrad, A.U.; Howcroft, J. & Zaman, N. (2000). Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 898-905.
- Bryan, G.M.; Gibbs, P.E.; Pascoe, P.L. & Burt, G.R. (1987). The use of the dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association U. K.* **67**, 507-523.
- Burgess, M. & Scott, K.J. (1992). The significance of in-place contaminated marine sediments on the water column: process and effects. In: Burton, Jr. A. G. (eds.), Sediment toxicity assessment. *Lewis Publishers*, Boca Raton. pp. 129-165 p.
- Burt, J.S. & Ebell, G.F. (1995). Organic Pollutants in Mussels and Sediments of the Coastal Waters Off Perth, Western-Australia. *Marine Pollution Bulletin* **30**, 723-732.
- Burton, Jr.G.A. & Scott, K.J. (1992). Sediment Toxicity Evaluations: Their Niche In Ecological Assessment. *Environmental Science & Technology* **26**, 2068-2075.
- Bushong, S., Jr.; Hall, W.; Johnson, W. & Hall, L., Jr. (1987). Toxicity of Tributyltin to Selected Chesapeake Bay Biota. pp. 1499-1503.
- Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* **247**, 295-311.

- Callow, M. (1990). Ship Fouling - Problems and Solutions. *Chemistry & Industry* **5**, 123-127.
- Cao, D.D.; Jiang, G.B.; Zhou, Q.F. & Yang, R.Q. (2009). Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk. *Journal of Environmental Management* **90**, S16-S24.
- Castro, I.B.; Bemvenuti, C.E. & Fillmann, G. (2007a). Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology* **2**, 73-79.
- Castro, I.B.; Lima, A.F.A.; Braga, A.R.C. & Rocha-Barreira, C.A. (2007b). Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology* **2**, 81-91.
- Cesar, A.; Pereira, C.D.S.; Santos, A.R.; Abessa, D.M.S.; Fernández, N.; Choueri, R.B. & DelValls, T.A. (2006). Ecotoxicological Assessment Of Sediment From The Santos And São Vicente Estuarine System - Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* **54**, 55-63.
- CETESB (1989). Norma Técnica L5.321:1989, Água - "Determinação do potencial de crescimento algáceo". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 15 p.
- CETESB (1990a). Norma Técnica L5.321:1989, Água - "Teste de toxicidade aguda com peixes - Parte I - sistema estático". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 29 p.
- CETESB (1990b). Norma Técnica L5.321:1989, Água - "Teste de toxicidade aguda com peixes - Parte I - sistema estático". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 29 p.
- CETESB (1990c). Relatório Anual de desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 28 p.
- CETESB (1991a). Norma Técnica L5.022:1991, Água - "Avaliação de toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard 1894 (Cladocera, Crustacea)". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 25 p.
- CETESB (1991b). Norma Técnica L5.018:1991, Água - "Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 33 p.
- CETESB (1992). Norma Técnica L5.251:1992, Água do mar - "Teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*, Silva, 1979". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 19 p.
- CETESB (1999). Norma Técnica L5.250:1999, Água do mar - "Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 20 p.

- CETESB (2001). Norma Técnica L5. 227:2001, "Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. (Met. de Ensaio)". *Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental*, São Paulo, 11 p.
- Chambers, L.D.; Stokes, K.R.; Walsh, F.C. & Wood, R.J.K. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology* **201**, 3642-3652.
- Champ, M.A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment* **258**, 21-71.
- Champ, M.A. & Lowenstein, F.L. (1987). TBT - the Dilemma of High-Technology Antifouling Paints. *Oceanus* **30**, 69-77.
- Chapman, P.M. (1986). Sediment Quality Criteria from the Sediment Quality Triad - An Example. *Environmental Toxicology and Chemistry* **5**, 957-964.
- Chapman, P.M. (1989). Current Approaches to Developing Sediment Quality Criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 589-599.
- Chapman, P.M.; Anderson, B.; Carr, S.; Engle, V.; Green, R.; Hameedi, J.; Harmon, M.; Haverland, P.; Hyland, J.; Ingersoll, C.; Long, E.; Rodgers, J.; Salazar, M.; Sibley, P.K.; Smith, P.J.; Swartz, R.C.; Thompson, B. & Windom, H. (1997). General guidelines for using the sediment quality triad. *Marine Pollution Bulletin* **34**, 368-372.
- Chapman, P.M. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 7-15.
- Chapman, P.M. & Long, E.R. (1983a). The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin* **14**, 81-84.
- Chapman, P.M. & Long, E.R. (1983b). The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin* **14**, 81-84.
- Christoffersen, K.; Hansen, B.W.; Johansson, L.S. & Krog, E. (2003). Influence of LAS on marine calanoid copepod population dynamics and potential reproduction. *Aquatic Toxicology* **63**, 405-416.
- Cima, F. & Ballarin, L. (2008). Effects of Antifouling Paints Alternative to Organotin-Based Ones on Macrofouling Biocoenosis of Hard Substrates in the Lagoon of Venice. *Fresenius Environmental Bulletin* **17**, 1901-1908.
- Cima, F.; Bragadin, M. & Ballarin, L. (2008). Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes: I. Sea-Nine 211(TM) and chlorothalonil. *Aquatic Toxicology* **86**, 299-312.
- Cima, F.; Marin, M.G.; Matozzo V.; DA Ros, L. & Ballarin, L. (1999). Biomarkers for TBT Immunotoxicity Studies on the Cultivated Clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Marine Pollution Bulletin* **39**, 112-115.

- Clark, E.L.; Sterrit, R.M. & Lester, J.N. (1988). The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment a Look at the Data. *Environmental Science and Technology* **22**, 600-604.
- Comber, S.D.; Gardner M.J. & Boxall, A.B.A. (2002). Survey of four marine antifoulant constituents (copper, zinc, diuron and Irgarol 1051) in two UK estuaries. *Journal Environmental Monitoring* **4**, 417-425.
- CONAMA (2004). Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Resolução CONAMA nº 344, 25 de março de 2004. *Diário Oficial da União* **87**.
- CONAMA (2005). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União* **53**, 58-63.
- CONAMA (2007). Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências. Resolução CONAMA nº 393, 08 de março de 2007. *Diário Oficial da União*.
- Cooney, J.D. (1995). Freshwater tests. In: Rand, G. M. (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology*.
- Cornelis, C.; Bierkens, J.; Joris, I.; Nielsen, P. & Pensaert, S. (2006). Quality criteria for re-use of organotin-containing sediments on land. *Journal of Soils and Sediments* **6**, 156-162.
- Costa, J. B. (1997). Avaliação da adequabilidade de *Kalliapseudes schubartii* Mané-Garzón, 1922 (Crustácea: Tanaidacea) como organismo-teste para utilização em ensaios de toxicidade de sedimentos estuarinos. Monografia de Graduação, Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Rio Grande, RS. 55 p.
- Cresswell, T.; Richards, J.P.; Glegg, G.A. & Readman, J.W. (2006). The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* **52**, 1169-1175.
- Dahl, B. & Blanck, H. (1996). Use of sand-living microalgal communities (epipsammon) in ecotoxicological testing. *Marine Ecology-Progress Series* **144**, 163-173.
- Dawson, P.H.; Bubb, J.M. & Lester, J.N. (1992). Organotin distribution in sediments and waters of sediment and waters of selected east coast estuarine in UK. *Marine Pollution Bulletin* **24**, 492-498.
- De Mora, S.J. & Pelletier, E. (1997). Environmental tributyltin research: Past, present, future. *Environmental Technology* **18**, 1169-1177.
- De Witt, T.H.; Swartz, R.C. & Lamberson, J.O. (1992). The Acute Toxicity Of Estuarine Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 1035-1048.

- Devilla, R.A.; B.M.T.; Donkin, M. & Readman, J.W. (2005a). The effects of a PSII inhibitor on phytoplankton community structure as assessed by HPLC pigment analyses, microscopy and flow cytometry. *Aquatic Toxicology* **71**, 25-38.
- Devilla, R.A.; Brown, M.T.; Donkin, M.; Tarran, G.A.; Aiken, J. & Readman, J.W. (2005b). Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Ecology Progress Series* **286**, 1-12.
- deYoung, B.; Heath, M.; Werner, F.; Chai, F.; Megrey, B. & Monfray, P. (2004). Challenges of Modeling ocean basin ecosystems. *Science* **304**, 1463-1466.
- Dinnel, P.A.; Link, J.M.; Stober, Q.J.; Letourneau, M.W. & Roberts, W.E. (1989). Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metal and pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**, 748-755.
- Dinnel, P. A. & Stober, Q. J. (1985). Circular n^o 85-3, Methodology and analysis of sea urchin embryo bioassays. *Fisheries Research Institute, School of Fisheries, University of Washington, Washington*, 19 p.
- Dubey, S.K. & Roy, U. (2003). Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Applied Organometallic Chemistry* **17**, 3-8.
- Environment Canada (1992). Report EPS 1/RM/25:1992, Biological Test Method: "Growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*". Ottawa, Ontario - Canada, 41 p.
- Environment Canada (1996). Report EPS 1/RM/11:(1990)1996, Biological Test Method: "Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp.". Ottawa, Ontario - Canada, 55 p.
- Environment Canada (1997a). Report EPS 1/RM/27:(1992)1997, Biological Test Method: "Fertilization assay using echinoids (sea urchin and sand dollars)". Ottawa, Ontario - Canada, 97 p.
- Environment Canada (1997b). Report EPS 1/RM/33:1997, Biological Test Method: "Test for Survival and Growth in Sediment Using the freshwater Amphipod *Hyalella azteca*". Ottawa, Ontario - Canada, 141 p.
- Environment Canada (1998a). Report EPS 1/RM/26:(1992)1998, Biological test method: "Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods". Ottawa, Ontario - Canada, 83 p.
- Environment Canada (1998b). Reference Method EPS 1/RM/35:1998, Biological Test Method: "Reference Method for Determining Acute Lethality of Sediment to Marine or Estuarine Amphipods". Ottawa, Ontario - Canada, 56 p.
- Environment Canada (1998c). Report EPS 1/RM/28:(1992)1998, Biological Test Method: "Toxicity test using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon)". Ottawa, Ontario - Canada, 79 p.

- Environment Canada (2000a). Report EPS 1/RM/10:(1990)2000, Biological Test Method: "Acute lethality test using threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". Ottawa, Ontario - Canada, 45 p.
- Environment Canada (2000b). Reference Method EPS 1/RM/14:2000, Biological Test Method: "Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*". Ottawa, Ontario - Canada, 21 p.
- Environment Canada (2001). Report EPS 1/RM/41:1997, Biological test method: "Test for Survival and Growth in Sediment Using Spinoid Polychaete Worms (*Polydora cornuta*)". Ottawa, Ontario - Canada, 132 p.
- Environment Canada (2007a). Report EPS 1/RM/9:(1990)2007, Biological Test Method: "Acute lethality test using rainbow trout". Ottawa, Ontario - Canada, 51 p.
- Environment Canada (2007b). Report EPS 1/RM/25:2007, Biological Test Method: "Growth Inhibition Test Using a Freshwater Alga". Ottawa, Ontario - Canada, 53 p.
- Environment Canada (2007c). Report EPS 1/RM/13:(2000)2007, Biological Test Method: "Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout". Ottawa, Ontario - Canada, 23 p.
- Environment Canada (2007d). Report EPS 1/RM/37:(1999)2007, Biological Test Method: "Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*". Ottawa, Ontario - Canada, 112 p.
- Environment Canada (2007e). Report EPS 1/RM/21:(1992)2007, Biological Test Method: "Test of reproduction and survival using cladoceran *Ceriodaphnia dubia*". Ottawa, Ontario - Canada, 72 p.
- Evans, S.M.; Birchenough, A.C. & Brancato, M.S. (2000a). The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire? *Marine Pollution Bulletin* **40**, 204-211.
- Evans, S.M.; Birchenough, A.C. & Fletcher, H. (2000b). The Value and Validity of Community-based Research: TBT Contamination of the North Sea. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 220-225.
- Felizzola, J.F.; Wagener, A.D.R.; Almeida, A.C. & Lin, W.O. (2008). Butyltin speciation in sediments from Todos os Santos Bay (Bahia, Brazil) by GC-PFPD. *Quimica Nova* **31**, 89-93.
- Fent, K. (1996a). Ecotoxicology of Organotin Compounds. *Critical Reviews in Toxicology* **26**, 3-117.
- Fent, K. (1996b). Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. *Science of the Total Environment* **185**, 151-159.
- Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* **205**, 223-240.

- Fernandez, M.A.; Wagener, A.L.R.; Limaverde, A.M.; Scofield, A.L.; Pinheiro, F.M. & Rodrigues, E. (2005). Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research* **59**, 435-452.
- Fernandez, M.A.; Pinheiro, F.M.; de Quadros, J.P. & Camillo, J. (2007). An easy, non-destructive, probabilistic method to evaluate the imposex response of gastropod populations. *Marine Environmental Research* **63**, 41-54.
- Fernandez-Alba, A.R.; Hernando, M.D.; Piedra, L. & Chisti, Y. (2002). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* **456**, 303-312.
- Fillmann, G.; Medvedovsky, I. G. & Nehring, S. (2003). Projeto CENPES/PETROBRAS, Teste de toxicidade de sedimentos marinhos com o *Kalliapseudes schubartii* para determinação de efeitos de fluídos e cascalho de perfuração. 23 p.
- Fonseca, D.B. & D'Incao, F. (2003b). Growth and reproductive parameters of *Kalliapseudes schubartii* in the estuarine region of the Lagoa dos Patos (southern Brazil). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **83**, 931-935.
- Fonseca, D.B. & D'Incao, F. (2003a). Growth and reproductive parameters of *Kalliapseudes schubartii* in the estuarine region of the Lagoa dos Patos (southern Brazil). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **83**, 931-935.
- Fonseca, D.B. & D'Incao, F. (2006). Mortality of *Kalliapseudes schubartii* in unvegetated soft bottoms of the estuarine region of the Lagoa dos Patos. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 257-261.
- Fränze, O. (2006). Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecological Indicators* **6**, 114-136.
- Galloway, T.S. (2006). Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* **53**, 606-613.
- Gatidou, G.; Thomaidis, N.S. & Zhou, J.L. (2007). Fate of Irgarol 1051, Diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. *Environment International* **33**, 70-77.
- Giacomazzi, S. & Cochet, N. (2004). Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* **56**, 1021-1032.
- Giordano, F. (1986). Ouriços do sublitoral rochoso da região de São Sebastião/São Paulo - uma abordagem ecológica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 128 p.
- Girard, J.P.; Ferrua, C. & Pesando, D. (1997). Effects of tributyltin on Ca^{2+} homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs. *Aquatic Toxicology* **38**, 225-239.

- Godoi, A.F.L.; Favoreto, R. & Santiago-Silva, M. (2003a). Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos. *Química Nova* **26**, 708-716.
- Godoi, A.F.L.; Montone, R.C. & Santiago-Silva, M. (2003b). 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* **985**, 205-210.
- Gross, M.D. (1971). Carbon Determination. In: Carver, R. E. (eds.), *Procedures In Sedimentary Petrology*. Interscience, New York. pp. 573-596.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate animals. In: Smith, W. L. & Chanley, N. H. (eds.), *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press, New York. pp. 29-60.
- Hall, L.W.; Bushong, S.J.; Hall, W.S. & Johnson, W.E. (1988). Acute and Chronic Effects of Tributyltin on A Chesapeake Bay Copepod. *Environmental Toxicology and Chemistry* **7**, 41-46.
- Hall, L.W.; Giddings, J.M.; Solomon, K.R. & Balcomb, R. (1999). An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Critical Reviews in Toxicology* **29**, 367-437.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology* **11**, 714-719.
- Harino, H.; Arai, T.; Ohji, M. & Miyazaki, N. (2009). Environmental Chemistry of Alternative Biocides - Monitoring of Alternative Biocides (Asia). In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo Japan. pp. 431-432.
- Harino, H.; Fukushima, M. & Kawai, S. (1999). Temporal trends of organotin compounds in the aquatic environment of the Port of Osaka, Japan. *Environmental Pollution* **105**, 1-7.
- Harino, H.; Kitano, M.; Mori, Y.; Mochida, K.; Kakuno, A. & Arima, S. (2005). Degradation of antifouling booster biocides in water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**, 33-38.
- Harino, H. & Langston, W.J. (2009). Degradation of Alternative Biocides in the Aquatic Environment. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Tokyo - Japan. pp. 397-412.
- Hasan, M.A. & Juma, H.A. (1992). Assessment of Tributyltin in the Marine-Environment of Bahrain. *Marine Pollution Bulletin* **24**, 408-410.
- Hayward, B.W.; Stephenson, A.B.; Morley, M.; Riley, J.L. & Grenfell, H.R. (1997). Faunal changes in Waitemata Harbour sediments, 1930s-1990s. *Journal of the Royal Society of New Zealand* **27**, 1-20.

- Heinle, D. R. & Beaven, M. S. (1980). *Aquatic Invertebrate Bioassays. ASTM STP 715*, Toxicity of Chlorine-Produced Oxidants to Estuarine Copepods. 130 p.
- His, E.; Heyvang, I.; Geffard, O. & Montaudouin, X. (1999). A comparison between Oyster (*Crassostrea gigas*) and Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research* **33**, 1706-1718.
- Hoch, M. (2001). Organotin compounds in the environment - an overview. *Applied Geochemistry* **16**, 719-743.
- Hoch, M. & Schwesig, D. (2004). Parameters controlling the partitioning of tributyltin (TBT) in aquatic systems. *Applied Geochemistry* **19**, 323-334.
- Hong, H.; Takahashi, S.; Min, B. & Tanabe, S. (2002). Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environmental Pollution* **117**, 475-486.
- Horiguchi, T. (2009). Mechanism of Imposex Induced by Organotins in Gastropods. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo - Japan. pp. 111-124.
- Huggett, R.J.; Unger, M.A.; Seligman, P.F. & Valkirs, A.O. (1992). The marine biocide tributyltin. Assessing and managing the environmental risks. *Environmental Science & Technology* **26**, 232-237.
- Ihara, P. M. (2008). Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande, RS. 86 p.
- IMO. (2000a). Basic facts about IMO. Adamson, Lee and Brown, Natasha. Focus on IMO. International Maritime Organisation. London, United Kingdom. Disponível em: www.imo.org. Data de acesso: 1/3/2008a.
- IMO (2000b). MT00 A23-038, Study of Greenhouse Gas Emissions from Ships. Final Report to the International Maritime Organization. *Norwegian Marine Technology Research Institute - MARINTEK*, Trondheim, Norway, 169 p.
- IMO. (2008). International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. <http://www.imo.org/conventions/mainframe>. Data de acesso: 17/9/2008.
- Inaba, K.; Shiraishi, H. & Soma, Y. (1995). Effects of salinity, pH and Temperature on aqueous solubility of four organotin compounds. *Marine Pollution Bulletin*.
- ISO (1995). Standard 10253:1995, Water quality - "Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*". *International Organization for Standardization*, 8 p.
- ISO (1999). Standard 14669:1999, Water quality - "Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)". *International Organization for Standardization*, 16 p.

- Jones, R. (2005). The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. *Marine Pollution Bulletin* **51**, 495-506.
- Jones, R.J.; Muller, J.; Haynes, D. & Schreiber, U. (2003). Effects of herbicides diuron and atrazine on corals of the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Ecology-Progress Series* **251**, 153-167.
- Kaminski, S. M. (2004). Influência da alimentação sobre a reprodução e o desenvolvimento do copépodo calanoida *Acartia tonsa* DANA, 1984, em cultivo intensivo. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 66 p.
- Kan-Atireklap, S.; Tanabe, S.; Sanguansin, J.; Tabucanon, M.S. & Hungspreugs, M. (1997). Contamination by butyltin compounds and organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand coastal waters. *Environmental Pollution* **97**, 79-89.
- Kan-Atireklap, S.; Yen, N.T.H.; Tanabe, S. & Subramanian, A.N. (1998). Butyltin compounds and organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis* L.) from India. *Toxicological and Environmental Chemistry* **67**, 409-424.
- Kannan, K. & Tanabe, S. (2009). Global Contamination by Organotin Compounds. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo - Japan. pp. 39-60.
- Karlsson, J.; Breitholtz, M. & Eklund, B. (2006). A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* **52**, 1661-1667.
- Karlsson, J. & Eklund, B. (2004). New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin* **49**, 456-464.
- Key, P.B.; Chung, K.W.; Hoguet, J.; Sapozhnikova, Y. & Fulton, M.H. (2008). Effects of the anti-fouling herbicide Irgarol 1051 on two life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **43**, 50-55.
- Kim, N.S.; Shim, W.J.; Yim, U.H.; Ha, S.Y. & Park, P.S. (2008). Assessment of tributyltin contamination in a shipyard area using a mussel transplantation approach. *Marine Pollution Bulletin* **57**, 883-888.
- Kobayashi, N. & Okamura, H. (2002). Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 748-751.
- Konstantinou, I.K. & Albanis, T.A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* **30**, 235-248.
- Kotrikla, A. (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management* **90**, S77-S85.

- Koutsaftis, A. & Aoyama, I. (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment* **387**, 166-174.
- Koutsaftis, A. & Aoyama, I. (2008). Toxicity of Diuron and copper pyrithione on the brine shrimp, *Artemia franciscana*: The effects of temperature and salinity. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **43**, 1581-1585.
- Kukkonen, J.V.K. & Landrum, P.F. (1998). Effect of particle-xenobiotic contact time on bioavailability of sediment-associated benzo(a)pyrene to benthic amphipod, *Diporeia* spp. *Aquatic Toxicology* **42**, 229-242.
- Kusk, K.O. & Petersen, S. (1997). Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 1629-1633.
- Kwok, K.W.H. & Leung, K.M.Y. (2005). Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. *Marine Pollution Bulletin* **51**, 830-837.
- Lam, K.; Cai, Z.; Wai, H.; Tsang, V.; Lam, M.; Cheung, R.; Yu, H. & Lam, P. (2005). Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters. *Environmental Pollution* **136**, 230.
- Lamparelli, M. C.; Costa, M. P.; Prósperi, V. A.; Bevilacqua, J. E.; Araújo, R. P.; Eysinc, G. G. J. & Pompéia, S. (2001). O.S. 12201200, Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - "Levantamento da contaminação ambiental do sistema estuarino de Santos e São Vicente". Levantamento da contaminação ambiental do sistema estuarino de Santos e São Vicente. *PROCOP - Programa de Controle de Poluição*, São Paulo, Brazil, 178 p.
- Langston, W.J. & Burt, G.R. (1991). Bioavailability and effects of sediment-bound TBT in deposit feeding clams, *Scrobicularia plana*. *Marine Environmental Research* **32**, 61-77.
- Langston, W.J.; Harino, H. & Pope, N.D. (2009). Behaviour of Organotins in the Coastal Environment. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M.; Langston, W. J. & . (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, pp. 75-94.
- Langston, W.J. & Pope, N.D. (1995). Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin* **31**, 32-43.
- Lau, M.M.M. (1991). Tributyltin Antifoulings - A Threat to the Hong-Kong Marine-Environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **20**, 299-304.
- Lee, C.C.; Wang, T.; Hsieh, C.Y. & Tien, C.J. (2005). Organotin contamination in fishes with different living patterns and its implications for human health risk in Taiwan. *Environmental Pollution* **137**, 198-208.

- Linden, E.; Bengtsson, B.E.; Svanberg, O. & Sundström, G. (1979). The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak and the harpacticoid. *Chemosphere* **8**, 843-851.
- Lindley, J.A.; Donkin, P.; Evans, S.V.; George, C.L. & Uil, K.F. (1999). Effects of two organochlorine compounds on hatching and viability of calanoid copepod eggs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **242**, 59-74.
- Liu, D.; Maguire, R.J. & Lau, Y.L. (1997). Transformation of the new antifouling compound Irgarol 1051 by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research* **31**, 2363-2369.
- Luchini, L. C. (1987). Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, Diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 91 p.
- Luijten, J.G.A. (1987). Applications and biological effects of organotin compounds. In: Sawyer, A. K. (eds.), Organotin compounds. *Marcel Dekker Inc*, New York. pp. 931-974.
- Macken, A.; Giltrap, M.; Foley, B.; McGovern, E.; McHugh, B. & Davoren, M. (2008). A model compound study: The ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. *Environmental Pollution* **153**, 627-637.
- Manzo, S.; Buono, S. & Cremisini, C. (2006). Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**, 61-68.
- Marcic, C.; Le Hecho, I.; Denaix, L. & Lespes, G. (2006). TBT and TPhT persistence in a sludged soil. *Chemosphere* **65**, 2322-2332.
- Marin, M.G.; Moschino, V.; Cima F. & Celli, C. (2000). Embryotoxicity of butyltin compounds to the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Environmental Research* **50**, 231-235.
- Marinha do Brasil (2007). AN/FA/09/I, Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas antiincrustantes em embarcações - NORMAM-23/DPC. Portaria N° 76/DPC, de 30 de Julho de 2007. *Diretoria de Portos e Costa*, 30 p.
- Martínez, K.; Imma, F. & Barceló, D. (2000). Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **879**, 27-37.
- Matthias, C.L.; Bellama, J.M.; Olson, G.J. & Brinckman, F.E. (1986). Comprehensive Method for Determination of Aquatic Butyltin and Butylmethyltin Species at Ultratrace Levels Using Simultaneous Hydridization Extraction with Gas-Chromatography Flame Photometric Detection. *Environmental Science & Technology* **20**, 609-615.

- Mauchline, J.; Blaxter, J. H. S.; Southward, A. J. & Tyler, P. A. (1998). Advances in marine biology - The biology of calanoid copepods - Introduction. *Academic Press LTD*, London. 124 p.
- Meador, J.P.; Krone, C.A.; Dyer, D.W. & Varanasi, U. (1997). Toxicity of Sediment-Associated Tributyltin to Infaunal Invertebrates: Species Comparison and the Role of Organic Carbon. *Marine Environmental Research* **43**, 219-241.
- Medina, M. & Barata, C. (2004). Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture* **229**, 203-213.
- Melo, S. L. R. (1993). Testes de Toxicidade com Sedimentos Marinhos: Adequação de Metodologia para Anfípodo Escavador *Tiburonella viscana*. Dissertação de Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 172 p.
- Melo, S.L.R. & Abessa, D.M.S. (2002). Testes de Toxicidade com Sedimentos Marinhos utilizando Anfípodos. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. G. (eds.), Métodos Em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações No Brasil. *Artes Gráficas e Indústria*, São Paulo, SP. pp. 123-178.
- Melo, S.L.R. & Nipper, M. (2007). Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda : Platyischnopidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **66**, 412-420.
- Mensink, B.P.; Boon, J.P.; ten Hallers-Tjabbes, C.C.; van Hattum, B. & Koeman, J.H. (1997). Bioaccumulation of organotin compounds and imposex occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, the Netherlands). *Environmental Technology* **18**, 1235-1244.
- Mochida, K. & Fujii, K. (2009a). Further Effects of Alternative Biocides on Aquatic Organisms. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), Ecotoxicology of Antifouling Biocides. *Springer*, pp. 383-395.
- Mochida, K. & Fujii, K. (2009b). Toxicity of Organotin Compounds in Aquatic Organisms. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), Ecotoxicology of Antifouling Biocides. *Springer*, pp. 149-160.
- Molino, P.J.; Childs, S.; Hubbard, M.R.; Carey, J.M.; Burgman, M.A. & Wetherbee, R. (2009). Development of the primary bacterial microfouling layer on antifouling and fouling release coatings in temperate and tropical environments in Eastern Australia. *Biofouling* **25**, 149-162.
- Molino, P.J. & Wetherbee, R. (2008). The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling* **24**, 365-379.
- Montserrat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Lund Amado, L.; Martinez Gaspar Martins, C.; Lopes Leães Pinho, G.; Soares Chaves, I.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J. & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**, 221-234.

- Montagnolli, W.; Zamboni, A.; Luvizotto-Santos, R. & Yunes, J.S. (2004). Acute effects of *Microcystis aeruginosa* from the Patos Lagoon estuary, southern Brazil, on the microcrustacean *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea : Tanaidacea). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**, 463-469.
- Morcillo, Y. & Porte, C. (1997). Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquatic Toxicology* **38**, 35-46.
- Morcillo, Y.; Ronis, M.J.J. & Porte, C. (1998). Effects of tributyltin on the Phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquatic Toxicology* **42**, 1-13.
- Moreland, D.E. (1980). Mechanisms of Action of Herbicides. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **31**, 597-638.
- Moschino, V. & Marin, M.G. (2002). Spermiotoxicity and embryotoxicity of triphenyltin in the sea urchin *Paracentrotus lividus* Lmk. *Applied Organometallic Chemistry* **16**, 175-181.
- Murai, R.; Sugimoto, A.; Tanabe, S. & Takeuchi, I. (2008). Biomagnification profiles of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in Japanese coastal food webs elucidated by stable nitrogen isotope ratios. *Chemosphere* **73**, 1749-1756.
- Musumeci, M.R.; Nakagawa, L.E.; Luchini, L.C.; Matallo, M.B. & Andrea, M.M. (1995). Degradação do Diuron -¹⁴C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **30**, 775-778.
- Nascimento, I.A. (2002). Técnicas de coleta, preservação e preparo de amostras líquidas e de sedimento para testes de toxicidade. In: Nascimento, I.; Sousa, E. & Nipper, M. (eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo. pp. 15-23.
- Nebeker, A.V.; Schuytema, G.S.; Griffis, W.L.; Barbitta, J.A. & Carey, L.A. (1989). Effect of sediment organic carbon on survival of *Hyalella azteca* exposed to DDT and endrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 705-718.
- Nipper, M. (2002). Testes Estatísticos para Análise de Resultados de Testes de Toxicidade com Amostras Líquidas e Sedimento. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. (eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. *Comp & Art*, Salvador - BA. pp. 245-253.
- Nipper, M.; Bailey, H.; Jose, V. F. & Prospero, V. A. (1990a). Marine Bioassay and their Application In Coastal Management and Biological Monitoring. ACIESP, Águas de Lindóia, SP. pp. 160-170.
- Nipper, M. G. & Prósperi, V. A. (1993). Desenvolvimento de testes de toxicidade com organismos marinhos. Relatório Técnico. *CETESB*, São Paulo, 30 p.

- Nipper, M. G.; Prósperi, V. A.; Pedroso, C. B.; Zamboni, A. J. & Jose, V. F. (1990b). Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos marinhos. Relatório Técnico. *CETESB*, São Paulo, 40 p p.
- Nipper, M.G.; Prósperi, V.A. & Zamboni, A.J. (1993). Toxicity Testing with Coastal Species of Southeastern Brazil - Echinoderm Sperm and Embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **50**, 646-652.
- Oberdorster, E.; Rittschof, D. & Clellan-Green, P. (1998). Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: Comparison of Field and TBTA Cl-induced imposex. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 144-151.
- Ohji, M.; Arai, T. & Miyazaki, N. (2002a). Effects of tributyltin exposure in the embryonic stage on sex ratio and survival rate in the caprellid amphipod *Caprella danilevskii*. *Marine Ecology-Progress Series* **235**, 171-176.
- Ohji, M.; Takeuchi, I.; Takahashi, S.; Tanabe, S. & Miyazaki, N. (2002b). Differences in the acute toxicities of tributyltin between the Caprellidea and the Gammaridea (Crustacea: Amphipoda). *Marine Pollution Bulletin* **44**, 16-24.
- Okamura, H.; Aoyama, I.; Liu, D.; Maguire, R.J.; Pacepavicius, G.J. & Lau, Y.L. (2000). Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Research* **34**, 3523-3530.
- Okamura, H.; Aoyama, I.; Ono, Y. & Nishida, T. (2003). Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Marine Pollution Bulletin* **47**, 59-67.
- Omae, I. (2003). Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry* **17**, 81-105.
- Omae, I. (2006). Chemistry and Fate of Organotin Antifouling Biocides in the Environment. In: Konstantinou, I. K. (eds.), *The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin - Germany. pp. 17-50.
- Patricolo, E.; Mansueto, C.; D'Agati, P. & Pellerito, L. (2001). Organometallic complexes with biological molecules: XVI. Endocrine disruption effects of tributyltin(IV)chloride on metamorphosis of the ascidian larva. *Applied Organometallic Chemistry* **15**, 916-923.
- Perina, F. C. (2006). Comparação entre os efeitos da toxicidade de sedimentos sobre invertebrados bentônicos e vegetação das áreas internas do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. Monografia de Graduação, Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Unidade SãoVicente. São Vicente, SP. 90 p.
- Pinheiro, F.M.; Fernandez, M.A.; Fragoso, M.R.; Quadros, J.P.; Camillo, E. & Dos Santos, F.A. (2006). Assessing the impacts of organotin compounds in Ilha Grande Bay, (Rio de Janeiro, Brazil): Imposex and a multiple-source dispersion model. *Journal of Coastal Research* **3**, 1383-1388.
- Pinho, G.L.L.; Pedroso, M.S.; Rodrigues, S.C.; Souza, S.S. & Bianchini, A. (2007). Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*:

- Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquatic Toxicology* **84**, 62-70.
- Piver, W.T. (1973). Organotin Compounds: Industrial Applications and Biological Investigation. *Environmental Health Perspectives* **4**, 61-79.
- PNMA (1996). Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União. *Ministério do Meio Ambiente - MMA*, Brasília. 277 p.
- Postoma, H. (1967). Sediment transport and sedimentation in the estuarine environment. In: Lauff, G. H. (eds.), *Estuaries*. AAAS, Washington. pp. 158-179.
- Power, E.A. & Chapman, P.M. (1992). Assessing sediment quality. In: Burton, Jr. A. G. (eds.), *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publisher, Boca Raton. pp. 1-18.
- Price, W.W.; Heard, R.W. & Stuck, L. (1994). Observations on the genus *Mysidopsis* Sars, 1864 with the designation of a new genus, *Americamysis*, and the descriptions of *Americamysis alleni* and *Americamysis stucki* (Peracarida:Mysidacea: Mysidae), from the Gulf of Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **107**, 680-698.
- Prósperi, V. A. (1993). Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 132 p.
- Prósperi, V. A. (2002). Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, SP. 118 p.
- Prósperi, V.A. & Nascimento, I.A. (2006). Avaliação Ecotoxicológica de Ambientes Marinhos e Estuarinos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos. pp. 269-292.
- Prudente, M.; Chihashi, H.; Kan-Atireklap, S.; Iwata, H. & Tanabe, S. (1999). Butyltins, organochlorines and metal levels in green mussel, *Perna viridis* L. from the coastal waters of the Philippines. *Fisheries Science* **65**, 441-447.
- Rachid, B. R. F. (1996). Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos. Tese de Doutorado, Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo. São Paulo. 106 p.
- Rand, G.M.; Wells, P.G. & McCarty, L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G. M. (eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Taylor & Francis, Washington, DC, USA. pp. 3-67.
- Razouls, S.; Razouls, C. & De Bovée, F. (2000). Biodiversity and biogeography of Antarctic copepods. *Antarctic Science* **12**, 343-362.

- Readman, J.W.; Kwong, L.L.W.; Grondin, D.; Bartocci, J.; Villeneuve, J.P. & Mee, L.D. (1993). Coastal Water Contamination from A Triazine Herbicide Used in Antifouling Paints. *Environmental Science & Technology* **27**, 1940-1942.
- Ritsema, R.; Laane, R.W.P.M. & Donard, O.F.X. (1991). Butyltins in Marine Waters of the Netherlands in 1988 and 1989 - Concentrations and Effects. *Marine Environmental Research* **32**, 243-260.
- Rocha, W. S. D. (2003). Sorção de 2,4-D e Diuron nos agregados organominerais de latossolos em função dos conteúdos de matéria orgânica e de água. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. 75 p.
- Ronis, M.J.J. & Mason, A.Z. (1996). The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo*: Effects of tributyltin. *Marine Environmental Research* **42**, 161-166.
- Roper, J.M.; Simmers, J.W. & Cherry, D.S. (2001). Bioaccumulation of butyltins in *Dreissena polymorpha* at a confined placement facility in Buffalo, New York. *Environmental Pollution* **111**, 447-452.
- Rossato, M. (2008). Avaliação do copépode *Acartia tonsa* como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos - Comparação entre diferentes espécies utilizadas no Brasil. Monografia de Graduação, Instituto de Oceanografia - Universidade Federal do Rio Grande. 63 p.
- Sabatini, M.E. (1990). The developmental stages (copepodis I to VI) of *Acartia tonsa* Dana, 1849 (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana* **59**, 53-61.
- Sakkas, V.A.; Lambropoulou, D.A. & Albanis, T.A. (2002). Photochemical degradation study of irgarol 1051 in natural waters: influence of humic and fulvic substances on the reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **147**, 135-141.
- Sekizawa, J.; Suter, G. & Birnbaum, L. (2003). Integrated Human and Ecological Risk Assessment: A Case Study of Tributyltin and Triphenyltin Compounds. *Human and Ecological Risk Assessment* **9**, 325-342.
- Shim, W.J.; Hong, S.H.; Kim, N.S.; Yim, U.H.; Li, D. & Oh, J.R. (2005). Assessment of butyl- and phenyltin pollution in the coastal environment of Korea using mussels and oysters. *Marine Pollution Bulletin* **51**, 922-931.
- Silva, J. & Souza, R. (2005). Água de Lastro e Bioinvasão. *Interciência*, 224 p.
- Skarphedinsdottir, H.; Olafsdottir, K.; Svavarsson, J. & Johannesson, T. (1996). Seasonal fluctuations of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in the dogwhelk, *Nucella lapillus* (L), and the blue mussel, *Mytilus edulis* L, in Icelandic waters. *Marine Pollution Bulletin* **32**, 358-361.

- Smith, A.J.; Thain, J.E. & Barry, J. (2006). Exploring the use of caged *Nucella lapillus* to monitor changes to TBT hotspot areas: A trial in the River Tyne estuary (UK). *Marine Environmental Research* **62**, 149-163.
- St-Jean, S.D.; Courtenay, S.C.; Pelletier, E. & St-Louis, R. (1999). Butyltin concentrations in sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) of the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. *Environmental Technology* **20**, 181-189.
- Stephenson, M.D.; Smith, D.R.; Goetzl, J.; Ichikawa, G. & Martin, M. (1986). Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay. *Ocean 86a conference record: science engineering adventure*. **4**, 1246-1251.
- Støttrup, J. & Norsker, N.H. (1997). Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* **155**, 235-251.
- Stringer, R.; Santillo, D.; Labunska, I. & Brigden, K. (2000). 22/00, Pollution with organic tin compounds, organochlorines, hydrocarbons and metals in sediment samples from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, UK.*, 66 p.
- Sudaryanto, A.; Takahashi, S.; Tanabe, S.; Muchtar, M. & Razak, H. (2000). Occurrence of butyltin compounds in mussels from Indonesian coastal waters and some Asian countries. *Water Science and Technology* **42**, 71-79.
- Sudaryanto, A.; Takahashi, S.; Iwata, H.; Tanabe, S. & Ismail, A. (2004). Contamination of butyltin compounds in Malaysian marine environments. *Environmental Pollution* **130**, 347-358.
- Suguio, K. (1973). *Introdução À Sedimentologia*. São Paulo. Edga Blücher, Edusp. 317p.
- Sverdrup, L.E.; Furst, C.S.; Weideborg, M.; Vik, E.A. & Stenersen, J. (2002). Relative sensitivity of one freshwater and two marine acute toxicity tests as determined by testing 30 offshore E & P chemicals. *Chemosphere* **46**, 311-318.
- tenHallerstjabbes, C.C.; Everaarts, J.M.; Mensink, B.P. & Boon, J.P. (1996). The decline of the North Sea whelk (*Buccinum undatum* L) between 1970 and 1990: A natural or a human-induced event? *Marine Ecology-Pubblicazioni Della Stazione Zoologica di Napoli I* **17**, 333-343.
- Thain, E. J. (1983). Report No. C. M. 1983/E.13, The acute toxicity of bis (tributyl tin) oxide to the adults and larvae of some marine organisms. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*, Copenhagen, 5pp p.
- Thomas, J.D. & Barnard, J.L. (1983). The Platyischnopidae Of América (Crustacea: Amphipoda). *Smithsonian Contr. Zoology*.V.375, 33 P. In:
- Thomas, K.V.; Blake, S.J. & Waldock, M.J. (2000). Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 739-745.

- Thomas, K.V. & Langford, K.H. (2009). The Analysis of Antifouling Paint Biocides in Water, Sediment and Biota. In: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M. & Langston, W. J. (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, pp. 311-330.
- Thomas, K.V.; Fileman, T.W.; Readman, J.W. & Waldock, M.J. (2001). Antifouling Paint Booster Biocides in the UK Coastal Environment and Potential Risks of Biological Effects. *Marine Pollution Bulletin* **42**, 677-688.
- Tolosa, I.; Readman, J.W.; Blaevoet, A.; Ghilini, S.; Bartocci, J. & Horvat, M. (1996). Contamination of Mediterranean (Cote d'Azur) coastal waters by organotins and irgarol 1051 used in antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin* **32**, 335-341.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1**, 151-173.
- Tsu-Chang, H.; Tung-Yi, L. & Tien-Fu, L. (1998). Determination of butyltins and phenyltins in oysters and fishes from Taiwan coastal waters. *Environmental Pollution* **102**, 197-203.
- Tsui, M.T.K. & Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* **52**, 1189-1197.
- U'Ren, S.C. (1983). Acute toxicity of bis(tributyltin) oxide to a marine copepod. *Marine Pollution Bulletin* **14**, 303-306.
- Ueno, D.; Inoue, S.; Takahashi, S.; Ikeda, K.; Tanaka, H.; Subramanian, A.N.; Fillmann, G.; Lam, P.K.S.; Zheng, J.; Muchtar, M.; Prudente, M.; Chung, K. & Tanabe, S. (2004). Global pollution monitoring of butyltin compounds using skipjack tuna as a bioindicator. *Environmental Pollution* **127**, 1-12.
- USEPA (2001). EPA 823-B-0-002:2001, "Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual". U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, 253 p.
- USEPA (2002a). EPA-821-R-02-012, Fifth Edition, "Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms". U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, 266 p.
- USEPA (2002b). EPA-821-R-02-013, Fourth Edition, "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to Freshwater organisms". U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, 335 p.
- USEPA (2002c). EPA-821-R-02-014, Third Edition, "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms". U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, 464 p.

- USEPA (2003). EPA 822-R-03-031, Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT) - Final. U. S. Environmental Protection Agency - Office of Water, Washington, DC, 129 p.
- van Wezel, A.P. & van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology* **66**, 427-444.
- Villa, L.; Agati, P.D.; Pellerito, C.; Scopelliti, M.; Fiore, T.; Nagy, L. & Pellerito, L. (2003). Effects of tributyltin(IV) chloride on the gametes and fertilization of *Ascidia malaca* (Ascidiacea: Tunicata) . *Applied Organometallic Chemistry*. **17**, 106-112.
- Voulvoulis, N. (2006). Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and Partitioning in Water and Sediments. In: Konstantinou, I. K. (eds.), Handbook of Environmental Chemistry. Springer, Berlin. pp. 155-170.
- Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M.D. & Lester, J.N. (1999). Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry* **13**, 135-143.
- Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M.D. & Lester, J.N. (2000). Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin* **40**, 938-946.
- Wakabara, Y. & Serejo, C. (1998). Malacostraca - Peracarida. Amphipoda. Gammaridea and Caprellidea. In: Young, P. S. (eds.), Catalogue of Crustacea of Brazil. *Museu Nacional*, Rio de Janeiro. pp. 561-594.
- Waldock, M.J.; Thain, J.E. & Waite, M.E. (1987). The distribution and potential toxic effects of TBT in UK estuaries during 1986. *Applied Organometallic Chemistry* **1**, 287-301.
- Waldock, M.J. & Thain, E.J. (1983). Shell Thickening in *Crassostrea gigas*: Organotin Antifouling or Sediment Induced? *Marine Pollution Bulletin* **14**, 411-415.
- Walmsley, S. (2002). FND053998, Tributyltin pollution on a global scale. An overview of relevant and recent research: impacts and issues. *Marine Biological Association*, Plymouth, UK.,
- Ward, T. J.; Rider, E. D. & Drozdowski, D. A. (1979). *Aquatic Invertebrate Bioassays*. ASTM STP 667, A Chronic Toxicity Test with the Marine Copepod *Acartia tonsa*. American Society for Testing and Materials, 158 p.
- Wauchope, R.D. (1978). Pesticide Content of Surface-Water Draining from Agricultural Fields - Review. *Journal of Environmental Quality* **7**, 459-472.
- Webber, M.K. & Roff, J.C. (1995). Annual Structure of the Copepod Community and Its Associated Pelagic Environment Off Discovery-Bay, Jamaica. *Marine Biology* **123**, 467-479.

- Wessels, J.S.C. & Vanderveen, R. (1956). The Action of Some Derivatives of Phenylurethan and of 3-Phenyl-1,1-Dimethylurea on the Hill Reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **19**, 548-549.
- Willis, K.J. & Ling, N. (2003). The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to planktonic marine copepods. *Aquaculture* **221**, 289-297.
- Yang, F.; Maguire, R.J. & Chau, Y.K. (2001). Occurrence of butyltin compounds in freshwater mussels (*Elliptio complanata*) from contaminated aquatic areas in Ontario, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada* **36**, 805-814.
- Yebra, D.M.; Kiil, S. & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75-104.
- Yngve, V. (1940). Stabilized vinyl resins. 118568. Patente n°:2219463. CARBIDE & CARBON CHEM CORP Class Code In't: C08K5/56; C08K5/57; C08K5/00. Class Code US: 524/175, 252/400.510. USA.pp. 1-2.
- Young, C. F. T. (1867). The Fouling and Corrosion of Iron Ships: Their Causes of Prevention, with Mode of Application to the Existing Iron-Clads. *The London Drawing Association*, London. 212 p.
- Zagatto, P.A. (2006a). Avaliação de Risco e do Potencial de Periculosidade Ambiental de Agentes Químicos para o Ambiente Aquático. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos, SP. pp. 383-411.
- Zagatto, P.A. (2006b). Ecotoxicologia. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos. pp. 1-13.
- Zakrewski, S. F. (1991). Principles of Environmental Toxicology. *American Chemical Society*, Washington, DC.
- Zamboni, A.J. & Costa, J.B. (2002). Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando tanaidáceos. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. (eds.), *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Comp & Art, Salvador - BA. pp. 179-188.
- Zamboni, A. J.; Dutra, A.; Gama, A. M.; Maurenre, N.; Medvedovsky, I. G. & Montú, M. (1998). O acidente com o navio "Bahamas" no Porto de Rio Grande: avaliação ecotoxicológica do lançamento de ácido sulfúrico às águas do estuário da Lagoa dos Patos. In: ECOTOX: Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia 5 - Anais, Itajaí, SC. pp. 10.