

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho Acadêmico

**Avaliação da Toxicidade Aguda de Organoestânicos sobre o
microcrustáceo *Mysidopsis juniae* Silva, 1979**

Bianca Fell Marques

Pelotas, 2008

Bianca Fell Marques

Avaliação da Toxicidade Aguda de Organoestânicos sobre o microcrustáceo

***Mysidopsis juniae* Silva, 1979**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Gilberto Fillmann
Co-Orientador: Clóvis Alt

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Dr. Gilberto Fillmann (Orientador)

Dra. Grasiela Lopes Leães Pinho

MSc. Ítalo Braga de Castro

Biol. Fernando Perina

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Jorge e Ilse e ao meu irmão Régis que foram os responsáveis para que eu conseguisse chegar até aqui e cumprir essa etapa tão importante da minha vida.

Ao meu namorado Igor, um agradecimento especial, pelo carinho, apoio e compreensão em todas as horas.

Às minhas amigas Marcela, Luciana e Bruna que, mesmo de longe, compartilharam bons e maus momentos e sempre torceram pelas minhas vitórias.

Às minhas colegas de curso e amigas Anne e Regina pelos vários momentos que passamos juntas durante esses cinco anos e pela grande ajuda sempre que necessário.

À minha Instituição de ensino UFPel por toda a bagagem intelectual, adquirida através de conhecimento e descobrimento.

Ao meu orientador, prof. Dr. Gilberto Fillmann, pela orientação e pela confiança na execução deste trabalho.

Aos meus colegas e, principalmente, amigos do CONECO: Fernando e Ítalo pelo grande esforço e colaboração para que esta monografia saísse da melhor forma possível, a Samile pelo companheirismo e apoio moral nas horas de maior preocupação, a Grasiela pela sua colaboração intelectual, ao Lucas pela parceria dentro e fora do laboratório e a todos os outros que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

Resumo

A partir da década de 1960 compostos orgânicos de estanho (COEs) como o Tributilestanho (TBT) e o Trifenilestanho (TPT) passaram a ser aplicados às tintas para evitar incrustação por organismos em estruturas submetidas ao contato direto e prolongado com a água do mar. Apesar da elevada eficiência das tintas antiincrustantes a base de COEs, uma série de estudos verificaram sua ação danosa sobre a biota marinha e estes vem sendo restringidas e substituídas no mundo todo. No Brasil não existe legislação pertinente a utilização de tintas antiincrustantes. Portanto, é imprescindível a geração de dados ecotoxicológicos com espécies nativas, visando estabelecer limites seguros de concentrações que garantam a qualidade ambiental das águas, principalmente das regiões portuárias. O presente trabalho objetiva avaliar a sensibilidade da espécie de microcrustáceo *Mysidopsis juniae* frente à exposição aos compostos tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) através de ensaios de toxicidade aguda, a fim de avaliar se esta espécie pode ser utilizada em monitoramentos ambientais e para contribuir para a definição de limites seguros destes compostos em águas brasileiras. As soluções de TBT e TPT foram preparadas nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A CL50 – 96h (concentração letal para 50% dos indivíduos em 96 horas) foi calculada pelo método *Trimmed Spearman Karber*, e os valores encontrados foram de 2,05 (1,52 – 2,78) $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBT e de 2,98 (2,27 – 3,91) $\mu\text{g L}^{-1}$ para TPT. Estes resultados serviram para comprovar que o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* possui uma alta sensibilidade aos compostos Tributilestanho (TBT) e Trifenilestanho (TPT), podendo ser usado em monitoramentos ambientais e irão contribuir também, juntamente com a realização de novos ensaios que garantirão uma maior confiabilidade no nosso estudo, como dados importantes na realização de uma nova resolução com base em espécies nativas e limites condizentes com a realidade brasileira.

Palavras-chave: Toxicidade Aguda; Organoestânicos; *Mysidopsis juniae*.

Lista de Figuras

Figura 1	Comunidade bioincrustante (“Fouling”) em casco de embarcação. 13
Figura 2	Ciclo simplificado dos Compostos Organoestânicos (COEs) em ambientes marinhos.....14
Figura 3	Tributilestanho e Trifenilestanho e seus respectivos produtos de desbutilação e desfenilação (formas cloradas).....15
Figura4	Organismo-teste <i>Mysidopsis juniae</i> (macho).....20

Lista de Tabelas

Tabela 1	Taxa de sobrevivência de <i>Mysidopsis juniae</i> em diferentes concentrações de tributilestanho (TBT).....	24
Tabela 2	Taxa de sobrevivência de <i>Mysidopsis juniae</i> em diferentes concentrações de trifenilestanho (TPT).....	25
Tabela 3	Concentração letal para 50% dos organismos (CL ₅₀) expostos ao tributilestanho (TBT) observada em diversas espécies de microcrustáceos.	28

Sumário

1. Introdução	8
2. Revisão Bibliográfica.....	10
2.1 Toxicologia Aquática	10
2.2 Ensaio de toxicidade	11
2.3 Compostos Organoestânicos (COEs)	11
2.4 Compostos Organoestânicos no Ambiente Marinho	13
2.5 Toxicidade dos Compostos Organoestânicos	16
2.6 Legislação	17
2.7 Organismo-teste (<i>Mysidopsis juniae</i>)	19
3. Metodologia.....	21
3.1 Cultivo de <i>Mysidopsis juniae</i>	21
3.2 Preparo das soluções dos Compostos Organoestânicos (COEs).....	22
3.3 Lavagem do material utilizado.....	22
3.4 Ensaio de Toxicidade Aguda.....	23
4. Resultados	24
4.1 Tributilestanho (TBT).....	24
4.2 Trifenilestanho (TPT).....	25
5. Discussão.....	26
6. Conclusão	30
7. Referências.....	31

1. INTRODUÇÃO

Vários são os grupos de compostos químicos conhecidos e que apresentam potencial impactante para o ambiente. Estima-se que mais de 70.000 compostos orgânicos sintéticos são utilizados atualmente nos mais diversos bens de consumo (SCHWARZENBACH et al.,1994) . É sabido que uma parcela significativa desses compostos acaba por chegar ao ambiente provocando uma variedade de problemas aos ecossistemas. Nesse contexto os oceanos acabam por representar o grande sorvedouro de boa parte desses compostos refletido claramente a situação da poluição global.

Dentre os diversos grupos de contaminantes orgânicos presentes em ecossistemas aquáticos despontaram nos últimos anos os biocidas utilizados como principio ativo de tintas antiincrustantes. Essas tintas foram desenvolvidas com a finalidade de prevenir a incrustação em cascos de embarcações e em estruturas que necessitam estar em contato com a água do mar. Vários compostos têm sido utilizados como componentes ativos dessas tintas, entre eles podemos citar: o óxido cuproso, o óxido de zinco, o tributilestanho, o trifenilestanho e mais recentemente o irgarol, o diuron, o clorotalonil, entre outros (ALMEIDA et al.,2007).

Diversos estudos têm sido realizados nas mais diversas áreas no intuito de avaliar o impacto provocado por compostos biocidas oriundos de tintas antiincrustantes, tais como determinações químicas da quantidade desses compostos presentes em matrizes ambientais como água, sedimentos e biota (ALMEIDA et al.,2007; ANTIZAR-LADISLAO,2008). Adicionalmente, avaliações da toxicidade desses compostos sobre diversos organismos - teste vêm também sendo realizadas (APPEL, 2004). Com base nos resultados obtidos por esses estudos foi possível criar legislações restringindo e/ou proibindo a comercialização, aplicação e utilização desses compostos (CASTRO et al., 2006) . Dentre os compostos que vêm recebendo mais atenção destacam-se os organoestânicos (tributilestanho-TBT e trifenilestanho-TPT) (EVANS, 1999).

Na América do Sul, entretanto, poucos são os estudos disponíveis sobre o assunto, o que resulta na quase inexistência de legislações ambientais que abranjam compostos utilizados como biocidas em tintas antiincrustantes. No Brasil, a resolução CONAMA-357 estabelece limites apenas para o tributilestanho na coluna de água, porém os limites estabelecidos por essa resolução não foram baseados em testes de toxicidade realizados com espécies nativas.

Objetivo

O presente trabalho objetiva avaliar a sensibilidade da espécie de microcrustáceo *Mysidopsis juniae* frente à exposição aos compostos tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) através de ensaios de toxicidade aguda, a fim de avaliar se esta espécie pode ser utilizada em monitoramentos ambientais e para contribuir para a definição de limites seguros destes compostos em águas brasileiras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Toxicologia Aquática

O crescente acúmulo de substâncias no ambiente marinho tem causado efeitos tóxicos para a biota e comprometido o equilíbrio dos ecossistemas. Além disso, os compostos tóxicos podem ser acumulados e transferidos através da cadeia alimentar fazendo com que a contaminação represente riscos para o homem.

A toxicologia aquática estuda os efeitos de substâncias químicas manufaturadas e de outros materiais, antropogênicos ou naturais, sobre organismos aquáticos. Esses efeitos, em nível de organismo, podem ser letais a curto e longo prazo, e sub-letais, tais como mudança de comportamento, alterações do crescimento, da reprodução, da tomada de alimento e outros. O potencial tóxico dessas substâncias pode ser avaliado através de ensaios de toxicidade, que são métodos padronizados utilizados para avaliar a capacidade inerente de uma dada substância ou amostra ambiental de causar efeito deletério a organismos vivos. Esses ensaios podem avaliar, em um primeiro momento, a toxicidade aguda para organismos, isto é, a capacidade na qual os efeitos observáveis aos organismos-teste ocorrem em curto espaço de tempo (NASCIMENTO et al.,2002).

Estudos toxicológicos do ambiente podem ser principalmente caracterizados como toxicologia ambiental. Esses estudos são normalmente realizados de forma independente de considerações ecológicas (CHAPMAN, 2002a) . A apreciação da ecologia é geralmente extrínseca, e não intrínseca ao estudo toxicológico. Em outras palavras, os ensaios são, em muitos casos, conduzidos com organismos que podem ser facilmente obtidos, cultivados e testados, visando obter dados preliminares quanto à toxicidade de substâncias puras ou misturas complexas de químicos sobre organismos representativos da biota. O significado ecológico dos testes com organismos costumava ser uma consideração secundária nesse tipo de estudo.

Entretanto, estão ocorrendo mudanças paradigmáticas, onde aspectos ecológicos e toxicológicos são também avaliados conjuntamente de modo que a ecotoxicologia está assumindo uma importância crescente (CHAPMAN, 2002b).

Avaliações ecotoxicológicas auxiliam o gerenciamento dos recursos hídricos, uma vez que fornecem informações a respeito dos impactos causados pela contaminação. Estes estudos são instrumentos úteis para avaliar a eficiência das medidas adotadas, que visam a eliminação ou redução dos efeitos de determinadas atividades ao ambiente (NASCIMENTO et al., 2002).

Recentemente, a Ecotoxicologia tem fornecido subsídios para a integração de informações ambientais. Esta ciência multidisciplinar utiliza-se de conhecimentos provenientes da química, farmacologia, bioquímica, fisiologia, biologia, ecologia, geologia, estatística, direito, engenharia, e outras (AZEVEDO et al., 2004) podendo integrar diferentes informações com base no peso de evidências (ABESSA, 2002) .

2.2 Ensaio de toxicidade

Um ensaio de toxicidade é um método, utilizado para avaliar a capacidade inerente de uma dada substância, ou amostra ambiental, em causar efeito deletério a organismos vivos, sendo eficiente instrumento de avaliação de água e/ou sedimento (NASCIMENTO et al., 2002). Pode ser definido como um ensaio, realizado sob condições controladas, nos quais organismos previamente selecionados são expostos aos contaminantes de interesse, sendo avaliada então a resposta dos organismos a essa exposição, após um período definido. Nos últimos anos, os ensaios ecotoxicológicos têm ganhado grande atenção e importância por parte da comunidade científica, pois permitem estimar tais efeitos, fornecendo um significado biológico aos dados químicos e complementando de forma eficiente os estudos de contaminação (RACHID, 1996).

2.3 Compostos Organoestânicos (COEs)

Os COEs apresentam a fórmula geral $R_nSnX_{(4-n)}$, onde R é um grupo alquil ou aril, X é uma espécie aniônica, como cloreto, óxido, hidróxido ou outro grupo funcional, e n varia de 1 a 4, estes compostos são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações estanho-carbono (GODOI et al., 2003). Os organoestanhos possuem uma série de propriedades e aplicações, dependendo do número de ligações Sn-C. Os compostos tetraorganoestânicos (R_4Sn) não possuem atividade biológica significativa e sua maior aplicação é como precursor para outros compostos organoestânicos em processos industriais. A atividade biológica máxima

ocorre nos compostos triorganoestânicos ($n = 3$) que são utilizados comercialmente como biocidas em várias áreas (LUDGATE, 1987).

As aplicações industriais de compostos orgânicos a base de estanho são conhecidas desde a década de 1920, quando os mesmos eram utilizados como fluido para transformadores e capacitores. No decorrer da década de 1960, o uso de organometálicos derivados do estanho difundiu-se bastante. Sendo utilizados, sobretudo como estabilizadores na produção de Cloreto de Polivinila (PVC) e como catalisadores de diversos processos industriais. Apesar das propriedades biocidas de organoestânicos como o Tributilestanho (TBT) e o Trifenilestanho (TPT) terem sido descobertos ainda na década de 1950, seu emprego em pesticidas, principalmente acaricidas e fungicidas, e como componente ativo de tintas de ação antiincrustante só se tornou comum na década de 1970 (LUDGATE, 1987; OYEWO, 1989; SCHATZBERG, 1987) .

Tintas antiincrustantes a base de TBT e TPT foram utilizadas em estruturas submetidas ao contato direto e prolongadas com água do mar, principalmente cascos de embarcações, estruturas destinadas à aquicultura, instalações oceânicas e de dutos submarinos (CHAMP, 2000).

A importância da utilização de tintas antiincrustantes reside no fato de que estruturas submetidas ao contato com a água do mar rapidamente se transformam em substrato para uma grande diversidade de organismos marinhos referidos genericamente como incrustantes (“fouling”) (Figura 1). A bioincrustação provocada é extremamente prejudicial para embarcações, uma vez que a comunidade aderida eleva o atrito do casco com água levando a uma maior exigência da potência dos motores e conseqüentemente a uma elevação no consumo de combustível e nos custos da viagem. Nesse aspecto, estimativas indicam que uma camada incrustante de apenas 100 μ m pode elevar o consumo de combustível de uma embarcação em até 6% (LIU et al., 1997) . No passado, esse problema foi combatido revestindo-se os cascos das embarcações com folhas de cobre e somente na década de 1960, o TBT passou a ser usado para essa finalidade (TEN HALLERS-TJABBES, 1997).

Rapidamente tintas a base de TBT passaram a ser empregadas por um grande número de embarcações, chegando durante a década de 1980 a revestir os cascos de 90% de todos os navios construídos no mundo. Nessa época 100% dos grandes navios da frota mercante do Japão utilizavam tintas desse tipo (LUDGATE,

1987). Devido a grande eficiência das tintas a base de COEs o período entre docagens aumentou drasticamente, e com isso, os custos de manutenção com as embarcações diminuíram (TEN HALLERS-TJABBES,1997). No período compreendido entre os anos de 1990 e 2003, apesar das restrições devido a sua alta toxicidade, estima-se que 70% dos navios do mundo ainda o utilizavam sob a forma de copolímero, liberando em média 4ug/cm² de tributilestanho diariamente na água do mar (SWENNEN et al.,1997) provocando uma série de danos aos ecossistemas marinhos.



Figura 1 - Comunidade bioincrustante (“Fouling”) em casco de embarcação.¹

2.4 Compostos Organoestânicos no Ambiente Marinho

Devido ao fato dos Compostos Orgânicos de Estanho (COEs), tais como o TBT e o TPT, serem utilizados principalmente em tintas antiincrustantes, áreas onde o fluxo de embarcações é intenso, principalmente terminais portuários, marinas e estaleiros apresentam-se normalmente impactadas por esses compostos. (BRYAN e LANGSTON, 1992; CLARK et al.,1988) .

¹ Web FURNAS. Disponível em:
<http://www.furnas.com.br/meioambiente_mexilhao2.asp>Acesso em: 24 out.2008.16: 30: 30.

De modo geral, esses compostos são liberados a partir dessas estruturas e chegam ao meio marinho onde sofrem processos de natureza física, química e biológica (Figura 2). Esses processos interferem diretamente sobre as concentrações de organoestânicos encontrados na coluna d'água e nos sedimentos marinhos. Entre os processos de natureza física, podemos ressaltar o transporte, a dispersão e a diluição. O transporte dependerá, via de regra, dos padrões de circulação observados na área e pode ser responsável pela presença do composto em áreas relativamente distantes da fonte (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

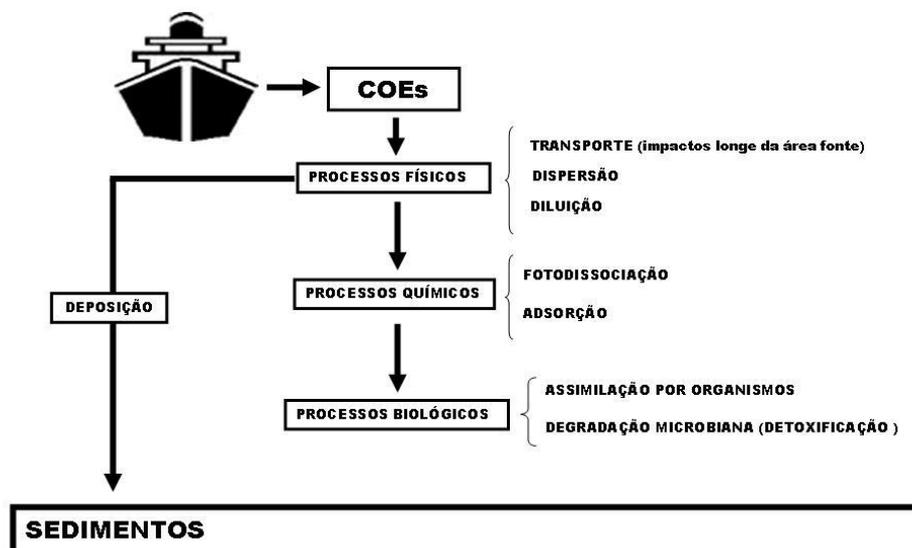


Figura 2 - Ciclo simplificado dos Compostos Organoestânicos (COEs) em ambientes marinhos.

Diversos fatores abióticos como a radiação UV, radiação gama e temperatura e também fatores bióticos como a biodegradação bacteriana são responsáveis pela transformação dos compostos organoestânicos originando compostos progressivamente mais simples e menos tóxicos. No caso do TBT, são formados o DBT (dibutilestanho) e o MBT (monobutilestanho) por desbutilação, enquanto que a desfenilação do TPT dá origem ao DPT (difenilestanho) e MPT (monofenilestanho) (Figura 3). A última etapa do processo seria a formação do estanho inorgânico que praticamente não é tóxico (CLARK et al., 1988).

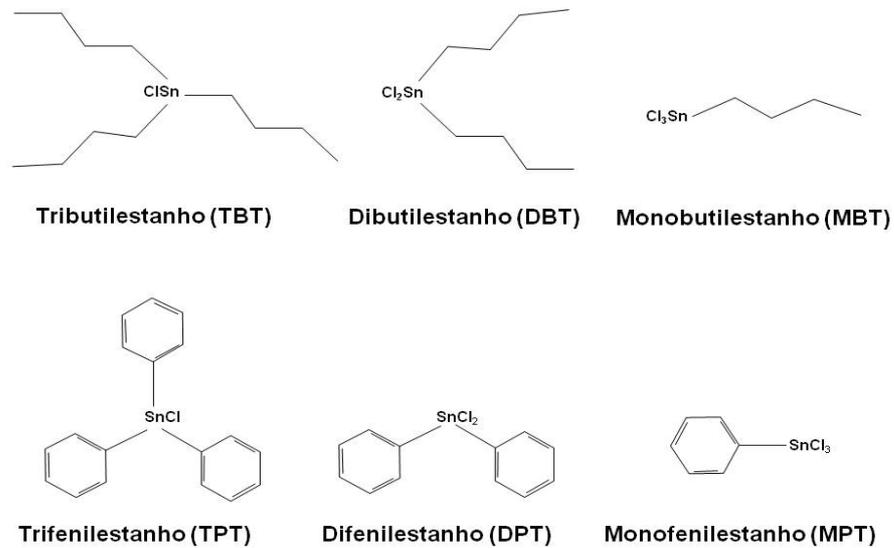


Figura 3 - Tributilestano e Trifenilestano e seus respectivos produtos de desbutilação e desfenilação (formas cloradas).

Estudos realizados por Clark *et al.* (1988), sugerem que o TBT apresenta uma degradação rápida (10 a 15 dias) quando na coluna d'água, entretanto, outros estudos mostraram que quando associados aos sedimentos anóxicos superficiais a sua meia vida (300 dias) aumenta substancialmente (DOWSON *et al.*,1996). Esse fato, aliado a grande afinidade dos COEs por material particulado torna os sedimentos marinhos um depósito natural e conseqüentemente uma fonte potencial destes compostos para a coluna d'água (CLARK *et al.*,1988; MORA e PHILLIPS,1997). Esse processo é particularmente importante no caso das dragagens costumeiramente realizadas em áreas portuárias no intuito de facilitar o acesso das embarcações aos cais de atracação.

2.5 Toxicidade dos Compostos Organoestânicos

Como o TBT é liberado gradativamente das pinturas antiincrustantes, esse composto acaba por provocar efeitos toxicológicos em organismos não alvo, isto é, organismos marinhos que não compõem necessariamente a comunidade bioincrustante. A cerca disso, existem diversos estudos que comprovam esses efeitos toxicológicos (DAVIES e MCKIE, 1987).

O primeiro caso onde se comprovou a ação tóxica do TBT em organismos não-alvos foi observado em 1975, na França com uma queda na produção de certos cultivos no molusco bivalve *Crassostrea gigas* que conviviam em uma área cercada por marinas e pequenos portos na baía de Arcachon (ALZIEU et al.,1982; ALZIEU,2000). Nesses animais, observou-se uma diminuição do número de jovens recém fixados, anomalias de desenvolvimento nas larvas e as conchas de indivíduos adultos passaram a apresentar o fenômeno do “balling”, formação de septos entre as camadas de carbonato de cálcio depositadas, que confere um formato arredondado as valvas e afetando o valor comercial destes animais (RUIZ et al., 1996; STEPHENSON et al.,1986; WALDOCK et al., 1995). Cultivos de *Mitillus edulis* (BEAUMONT e BUDD,1984; STEPHENSON et al.,1986), *Pecten maximus* (PAUL e DAVIES,1986), *Perna viridis* (KAN-ATIREKLAP et al.,1997; PRUDENTE et al.,1999) , *Crassostrea gigas* (WALDOCK, THAIN, and WAITE1995; WALDOCK et al.,1999) e do gastrópode *Chorus giganteus* (GOODING et al.,1999) em diferentes locais do mundo também têm sofrido com a ação tóxica do TBT, causando principalmente inibição do crescimento e aumento das taxas de mortalidade durante os cultivos.

Estudos realizados com aves marinhas, algumas das quais de comportamento migratório, que se alimentam principalmente de peixes e invertebrados marinhos, revelaram quantidades significativas de organoestânicos no fígado e nos rins desses animais. Em aves, os compostos organoestânicos provocam, sobretudo, a imunossupressão tornando- as mais vulneráveis a uma série de moléstias (GURUGE et al.,1997).

Estudos mais recentes constataram que uma conhecida espécie de fanerógama marinha, a *Ruppia maritima*, que é encontrada em ambientes contaminados, apresenta redução de 60% na sua atividade fotossintética, além de alterações na taxa respiratória e no crescimento, quando exposta ao TBT(JENSEN et al.,2004).

O grau de toxicidade a um determinado contaminante é diferente em cada organismo, por isso, várias espécies são selecionadas para demonstrar sua sensibilidade. Esses organismos são chamados de organismos teste e ajudam a avaliar quais os efeitos um composto pode causar na sua população e no meio em que ela vive. A toxicidade dos COEs, mesmo em concentrações muito baixas, foi observada em organismos de diferentes regiões do Mundo(DIMITRIOU et al.,2003b; VAN WEZEL e VAN VLAARDINGEN,2004).

Sidharthan, (2002) , demonstrou, através de ensaios ecotoxicológicos que o TBT pode afetar o crescimento e a produção de clorofila na alga *Nannochloropsis oculata*. Ohji (2005) também observou efeito agudo de TBTCI sobre 5 espécies de caprelídeos, enquanto que estudos com espécies de ouriços verificaram efeitos deletérios dos COEs sobre sua reprodução, afetando seus ovos e embriões (KOBAYASHI e OKAMURA, 2002; MARIN et al.,2000).

2.7 Legislação

As primeiras ações regulatórias e legislativas de gerenciamento de riscos para o tributilestanho (TBT) foram adotadas na França em 1982, em razão do impacto do TBT sobre ostras comercialmente cultivadas na baía de Arcachon (*Crasostrea gigas*). Em 1982, os franceses baniram a aplicação de tintas antiincrustantes contendo TBT em cascos de barcos menores que 25m. Essa regulamentação foi baseada no fato de que os barcos pequenos ficam muito tempo nos atracadouros e próximos da costa, onde o TBT liberado se acumula no sedimento, enquanto que os grandes barcos e navios passam a maior parte do tempo em alto mar, resultando na diluição do biocida em um grande volume de água (ALZIEU, 2000). Como conseqüência, foi observada uma diminuição significativa nas concentrações de COEs nas águas da baía de Arcachon, além de um aumento significativo na produção de ostras e diminuição na deformação das conchas (ALZIEU, 2000).

Os britânicos, similarmente, observaram os impactos sobre as populações de ostras que habitavam áreas de intensa atividade náutica. Dessa forma, o governo inglês introduziu, em 1985, regulamentações para impedir a venda de tintas de TBT contendo mais de 7,5% de estanho total em copolímeros ou 2,5% de estanho total como estanho livre, ou com uma taxa de liberação maior que $4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Juntamente com essas regulamentações, a Inglaterra estabeleceu uma concentração limite na água de $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ com o objetivo de proteger seus recursos marinhos. Em 26 de fevereiro de 1987, oficiais do departamento de Meio Ambiente Britânico determinaram a redução da concentração limite para $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ e a suspensão do fornecimento de tintas antiincrustantes contendo TBT para o uso em barcos menores de 25 m (CHAMP, 2000)

Em 1996, o Comitê de Proteção do Ambiente Marinho das Nações Unidas (MEPC) redigiu uma proposta sugerindo a retirada gradual das tintas à base de TBT nos 10 anos seguintes, culminando no banimento global em 2006. Apesar dos apelos de vários grupos ambientais e de certos países como o Japão (o qual banuiu a tinta dos cascos dos seus navios em 1992), essa proposta não obteve a adesão de um número suficiente de países (ALMEIDA et al.,2007). A Organização Marítima Internacional (IMO) então, redigiu uma nova proposta proibindo a aplicação de tintas a base de TBT em quaisquer embarcações a partir de 2003. Embarcações que haviam sido pintadas antes dessa data poderiam permanecer com seu revestimento até a data limite de janeiro de 2008, quando não seria mais permitida a presença de TBT em tintas antiincrustantes.

Embora a determinação para banimento global do TBT em tintas antiincrustantes tenha entrado em vigor, trabalhos recentes atestam que essas tintas continuam sendo utilizadas em países em desenvolvimento. (SHIM et al.,2005) . A falta de fiscalização e a ineficiência das novas tintas antiincrustantes tem contribuído para essa situação (ALMEIDA et al.,2007).

No Brasil, entrou em vigor em março de 2005, uma revisão da resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) que discorre sobre as condições e padrões de qualidade de águas. Nessa resolução (CONAMA 357/2005), as concentrações máximas de Tributilestanho permitidas são de 10 ng.L^{-1} para águas salinas de classe I e 370 ng.L^{-1} para águas salinas de classe II (CONAMA 2005). Embora a implantação dessa legislação represente um avanço, uma vez que, anteriormente, as leis brasileiras desconheciam esse composto e os impactos por ele gerados, acredita-se que é necessária a realização de estudos mais detalhados em território nacional para definir valores mais condizentes com nossa realidade, já que é sabido que concentrações na ordem de 1 ng. L^{-1} já são suficientes para induzir impacto sobre populações de organismos marinhos (ALZIEU, 2000).

2.7 Organismo-teste (*Mysidopsis juniae*)

Os misidáceos são pequenos organismos, pertencentes ao filo Crustacea, à Superordem Pericarida e Ordem Mysidacea. Esses animais se assemelham aos camarões e são conhecidos popularmente como camarões-gambá, pois possuem uma pequena bolsa na região ventral (marsúpio), cuja função é armazenar ovos e filhotes (BARNES, 1996a). Já foram descritas 780 espécies de misidáceos, sendo que as espécies marinhas vivem agregadas e associadas a algas e gramas tidais. Esses animais constituem uma parcela importante da dieta de alguns peixes (BARNES, 1996a).

A espécie *Mysidopsis juniae* foi descrita por Silva em 1979 (BARNES, 1996b). Tratando-se de uma espécie epibentônica de hábito onívoro. Sua principal característica morfológica que permite a distinção de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero é o formato do télson, que apresenta um tubérculo distal no ápice (Figura 4). A espécie *M. juniae* é encontrada na Norma Brasileira (ABNT) de Ecotoxicologia Aquática/ Toxicidade aguda/ Método de ensaio com misidáceos (Crustácea), tendo também seu próprio protocolo de testes (ABNT 2005).

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). Estes estudos resultaram na adaptação e padronização da metodologia para os ensaios de toxicidade aguda com essa espécie. Ensaio com misidáceos têm sido utilizados no Brasil para a avaliação da toxicidade de produtos químicos puros, efluentes domésticos e industriais, petróleo e misturas petróleo/dispersante, amostras ambientais, fluidos de perfuração, etc (NASCIMENTO et al., 2002).



Figura 4 - Organismo-teste *Mysidopsis juniae* (macho).

3. METODOLOGIA

Os ensaios toxicológicos, bem como o cultivo dos organismos utilizados foram realizados 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 nos cultivos e nos ensaios ecotoxicológicos (água de diluição) foi obtida da Estação Marinha de Aquicultura (FURG) coletada diretamente do ambiente. Em laboratório, a água foi filtrada em cartuchos de 1 µm de porosidade.

3.1 Cultivo de *Mysidopsis juniae*.

O cultivo foi mantido em sala climatizada sob condições controladas de temperatura (25°C) e fotoperíodo (12C: 12E) e contínua aeração. Os organismos foram mantidos em água marinha filtrada (salinidade 35) e alimentados diariamente com náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp. com 72h de idade. Para a manutenção da qualidade do cultivo, renovações de água foram realizadas semanalmente.

A manutenção de *Mysidopsis juniae* em cultivo exigiu o cultivo paralelo com o microcrustáceo *Artemia* sp. Esse cultivo foi iniciado para fornecer suporte na provisão diária de alimento ao cultivo de *M. juniae*. As artemias foram mantidas em béqueres de 100mL, enriquecidas com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau na proporção de 0,1mL de cada um dos óleos por 100mL de água de cultivo e 0,5g de cisto de *Artemia* sp. (ABNT, 2005).

3.2 Preparo das Soluções dos Compostos Organoestânicos (COEs)

As soluções-estoque com concentração de 5 mg.L^{-1} foram previamente preparadas através da dissolução dos padrões de Cloreto de Tributilestanho (TBT) e o Cloreto de Trifenilestanho (TPT) de grau analítico obtidos da Sigma-Aldrich (pureza > 98%) em acetona. Esse procedimento foi adotado em virtude da baixa solubilidade desses compostos em água.

As soluções - padrão de trabalho de 0, 001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$ foram obtidas a partir da diluição das soluções-estoque em água do mar natural filtrada através de um filtro de porosidade 0.3 μm . Essas soluções tiveram a salinidade ajustada para 35 utilizando sal artificial com características idênticas e condições gerais dos cultivos. Todas as soluções foram preparadas de modo à concentração de acetona não exceder 1% das mesmas. Testes preliminares realizados com *M. juniae* não apresentaram efeito em concentrações de até 5% de acetona (ROSSATO, 2008 / informação verbal).²

3.3 Lavagem do material utilizado

Toda vidraria utilizada foi lavada conforme o protocolo padrão do Laboratório onde é lavada inicialmente com água da torneira, seguida por imersão em detergente alcalino (4% v/v) por 24 horas e lavagens com água da torneira (5x), lavagem com acetona (5x), lavagem com água da torneira (5x), lavagem com álcool etílico (5x), lavagem com água da torneira (5x). Posteriormente é imerso em ácido nítrico (10% v/v) por 24 horas, seguido por uma lavagem com água da torneira (5x) e, finalmente, com água destilada (5x).

² Informação fornecida por M. ROSSATO através de uma comunicação pessoal no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática - CONECO, situado no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande-FURG, em agosto de 2008.

3.4 Ensaio de Toxicidade Aguda

Foi realizado um ensaio de toxicidade aguda com o misidáceo *Mysidopsis juniae* para cada COE, baseado na norma ABNT-15308 2005. Foram selecionados a partir do cultivo, organismos com idades entre 1 a 8 dias, sem distinção de sexo. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, dez misidáceos foram colocados em recipientes de vidro contendo 200mL de solução-padrão de TBT e TPT nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 µg.L⁻¹. Os ensaios para TPT foram realizados em triplicata enquanto que os ensaios para TBT foram realizados em quadruplicata. Os ensaios tiveram duração de 96h, e durante esse período foram mantidas as mesmas condições de cultivo com exceção da aeração.

O efeito observado foi a mortalidade dos organismos, a qual foi expressa pela ausência de movimento mesmo após estímulo físico do animal e confirmada através de observação a olho nu ou em lupa. A toxicidade das substâncias-teste foi expressa pela CL₅₀ 96h, referente à concentração letal a 50% dos organismos expostos ao final de 96 horas. Os valores de CL₅₀ e os limites de 95% de confiança foram calculados através do programa estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON et al., 1977).

Dados referentes a testes realizados com as substâncias de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) e Sulfato de Zinco foram obtidos a partir de outros estudos realizados com a espécie *M. juniae* em nosso laboratório. Os referidos estudos foram realizados com organismos oriundos do mesmo cultivo e nas mesmas condições supramencionadas. Essas informações são fundamentais para garantir que os organismos utilizados estão dentro de um padrão de sensibilidade aceitável (IHARA, 2008).

Como critério de aceitabilidade, foram considerados apenas os ensaios em que a mortalidade no Controle foi igual ou inferior a 10% (ABNT 2005) .

4. RESULTADOS

4.1 Tributilestanho (TBT)

Ao final de 96 horas, as taxas de sobrevivência observadas para o ensaio de TBT em cada concentração foram de 100% para 0,001 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$; 95% para 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$; 85% para 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e na concentração de 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a mortalidade foi total em todas as réplicas (Tabela 2). A CL_{50} encontrada foi de 2,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e os limites de 95% de confiança foram de 1,52 e 2,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 1 - Taxa de sobrevivência de *Mysidopsis juniae* em diferentes concentrações de Tributilestanho (TBT).

TBT Concentração (μL^{-1})	Sobrevivência (%)				Média
	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Réplica D	
Controle	100	100	100	100	100
0,001	100	100	100	100	100
0,01	100	100	100	80	95
0,1	100	100	100	100	100
1	100	80	80	80	85
10,0	0	0	0	0	0

4.2 Trifenilestanho (TPT)

Para o TPT, não houve mortalidade nas concentrações 0,001; 0,01 e 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que na concentração 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a sobrevivência média foi de 90%. Semelhante ao observado com TBT, houve mortalidade total na concentração de 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As taxas de sobrevivência estão expressas na tabela (Tabela 3). A CL_{50} (96h) foi de 2,98 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com intervalos de 2,27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 3,91 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 2 - Taxa de sobrevivência de *Mysidopsis juniae* em diferentes concentrações de Trifenilestanho (TPT).

TPT Concentração (μL^{-1})	Sobrevivência (%)			
	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
Controle	100	100	100	100
0,001	100	100	100	100
0,01	100	100	100	100
0,1	100	100	100	100
1	80	100	90	90
10	0	0	0	0

5. DISCUSSÃO

Conforme observado nos resultados, para TBT e TPT a faixa de concentrações onde se observou efeito tóxico ficou entre 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não tendo sido observado toxicidade em concentrações menores. Embora seja desejável realizar ensaios que abranjam concentrações dentro desta faixa, os dados obtidos permitiram calcular as CL_{50} para os compostos testados dentro de um intervalo de confiança considerado aceitável. De forma semelhante, outros estudos que avaliaram toxicidade aguda de organoestânicos sobre microcrustáceos trabalharam com faixas de concentrações com variação de 10 vezes para cada nível (OHJI et al.,2005).

A CL_{50} observada no presente estudo (2,05 $\mu\text{g. L}^{-1}$) para TBT se mostrou consistente com resultados encontrados em um ensaio com o misidáceo *M. juniae* (CL_{50} de 2,2 $\mu\text{g L}^{-1}$)(ROSSATO,informação verbal)³ e em um ensaio com a espécie de misidáceo *M. bahia* (CL_{50} 96 h de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) (GOODMAN et al.,1988). Adicionalmente os resultados obtidos em testes com as substâncias de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) e Sulfato de Zinco por IHARA, (2008), a qual utilizou misidáceos oriundos do mesmo cultivo, mostraram que os organismos utilizados encontram-se dentro do padrão de sensibilidade aceitável pela Environmental Protection Agency (EPA 2002) uma vez que os coeficientes de variação ficaram entre 22,8-26,1%, estando abaixo dos limites estabelecidos pela EPA que se encontram entre 11 e 167%.

Comparando com os resultados obtidos, embora a diferença observada entre os compostos possa parecer pequena e não pode ser testada estaticamente, o TBT (CL_{50} 96h 2,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$)apresenta uma toxicidade ligeiramente mais elevada do que o TPT(CL_{50} 96h 2,98 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Uma maior toxicidade para o TBT foi também observada em um estudo de efeitos sub-letais realizado com o molusco *Haliotis gigantea*, onde 100 ng.L^{-1} de TBT foi capaz de induzir espermatogênese em 80% das

³ Informação fornecida por M. ROSSATO através de uma comunicação pessoal no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática - CONECO, situado no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande-FURG, em agosto de 2008.

fêmeas, enquanto TPT nas mesmas condições, induziu em apenas 50 % (HORIGUCHI et al.,2002).

Ensaio ecotoxicológico onde os embriões do tunicado *Styela plicata* foram expostos separadamente a $0,1\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ de TBT e TPT demonstraram uma maior sobrevivência para TPT (81,6%) do que para TBT (65,2%) (CIMA et al.,1996a). Foi verificado que a exposição ao TBT e TPT, em suas formas cloradas, provoca atraso do desenvolvimento embrionário e imunotoxicidade nesta espécie (CIMA et al.,1996b). Similarmente, um estudo realizado com embriões do peixe *Sparus aurata* constatou efeitos de toxicidade aguda maiores para TBT ($\text{CL}_{50} - 28,29 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) do que para TPT ($\text{CL}_{50} - 34,17 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) (DIMITRIOU et al.,2003a). Embora uma boa parte dos estudos descritos sejam avaliações de efeitos sub-letais dos triorganoestânicos, pode-se verificar uma clara diferença de toxicidade entre TBT e TPT, de modo que os resultados obtidos no presente estudo vêm a corroborar com o conhecimento de que o tributilestanho apresenta uma toxicidade superior a do trifenilestanho.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, *M. juniae* apresentou-se como uma espécie apropriada para avaliação da toxicidade por compostos organoestânicos devido sua elevada sensibilidade aos mesmos. Outros estudos ecotoxicológicos realizados com microcrustáceos reportaram valores de CL_{50} superiores aos obtidos para *M. juniae* no presente estudo. OHJI et al. (2002a), por exemplo, encontrou CL_{50} de 17,8, 21,2 e 23,1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para os Gammaridae *Jassa seatteryi*, *Cerapus erae* e *Eohaustorioides sp.*, respectivamente. No mesmo estudo, a CL_{50} de TBT foi de 6,6, 4,6 e 5,9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para os caprelídeos *Caprella equilibra*, *Caprella subinermis*, *Caprella danilevskii*, respectivamente, demonstrando que todas as espécies mencionadas apresentam uma menor sensibilidade ao TBT do que *M. juniae*. Em contrapartida, KWOK et al. (2005) reportaram uma CL_{50} de 0,149 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para o copépode *Tigriopus japonicus*, demonstrando que essa espécie apresenta uma maior sensibilidade ao TBT em comparação a *M. juniae* no presente estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração letal para 50% dos organismos (CL50) expostos ao tributilestanho (TBT) observada em diversas espécies de microcrustáceos.

Espécie (grupo)	CL ₅₀ TBT (µg L ⁻¹)	Referência
<i>Mysidopsis juniae</i> (Misidaceo)	2,05	Presente estudo
<i>Mysidopsis bahia</i> (Misidaceo)	2,0	(GOODMAN et al., 1988)
<i>Tigriopus japonicas</i> (Copépode)	0,149	(KWOK e LEUNG, 2005)
<i>Caprella equilibra</i> (Caprelídeo)	6,6	(OHJI et al., 2002b)
<i>Caprella danilevskii</i> (Caprelídeo)	5,9	(OHJI et al., 2002b)
<i>Jassa seatteryi</i> (Gamarídeo)	17,8	(OHJI et al., 2002b)
<i>Cerapus erae</i> (Gamarídeo)	21,2	(OHJI et al., 2002b)
<i>Eohaustorioides sp.</i> (Gamarídeo)	23,1	(OHJI et al., 2002b)

Com base na resolução do CONAMA 357/2005, as concentrações máximas permitidas para tributilestanho são de 0,01 µg. L⁻¹ para águas salinas do tipo I e 0,37 µg.L⁻¹ para águas salinas do tipo II. Levando em consideração os resultados desse trabalho, esses limites poderiam ser considerados seguros. Entretanto, estudos envolvendo organismos pertencentes a outros níveis tróficos devem ser realizados a fim de comprovar essa hipótese uma vez que segundo diversos outros trabalhos, alguns organismos podem apresentar efeitos deletérios em concentrações inferiores aos estipulados pela referida resolução.

As concentrações de TBT e TPT em diversos ambientes aquáticos revelam que o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* poderia ser uma espécie ameaçada. AXIAK, 2000 realizou um estudo de impacto de TBT em Malta (no centro do Mediterrâneo) e encontrou concentrações entre 0,005 e 3 µg.L⁻¹ em coluna d'água, essa variação quando relacionada com os nossos resultados revelam que o microcrustáceo poderia sobreviver com uma CL₅₀ de 2,05 µg.L⁻¹ para TBT mas a concentração de 4 µg.L⁻¹, encontrada por KUEH, 2008 no sul da estação SM18 em um ambiente marinho em Hong Kong, *Mysidopsis juniae* seria letal.

No caso de uma análise dos resultados de TBT e TPT no presente estudo com um estudo feito por CHI, 2004 que detectou em uma amostra de água doce concentrações de $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para TBT e $4,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de para TPT, o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* também não iria sobreviver.

Flutuações sazonais nos níveis aquáticos de TBT são somente evidentes em áreas próximas a marinas. Em locais próximos a docagens, a concentração de TBT na coluna d'água são aumentados de acordo com o seu comprimento, de $0,050 \mu\text{g.L}^{-1}$ em 1m para $0,0096$ e $0,29 \mu\text{g.L}^{-1}$ em 14 m. Isso sugere a possibilidade de que no passado, esses locais junto a maioria dos estaleiros de reparação naval, liberavam os butils que são encontrados na coluna de água através de sedimentos contaminados (KWOK, 2005). Portanto, os sedimentos servem como fonte de contaminação de organoestênicos na coluna d'água, isso é demonstrado tanto em sedimentos de água doce como em água salgada. LEE, 2005 encontrou uma concentração de até 50 ng. g de TBT em sedimentos de água doce no Rio Damsui e 330 ng. g em um estuário em Taiwan.

6. CONCLUSÃO

A espécie *Mysidopsis juniae* demonstrou uma alta sensibilidade ao Tributilestanho (TBT) e ao Trifenilestanho (TPT) nos ensaios ecotoxicológicos agudos, comparados a ensaios realizados com outros organismos da literatura, podendo ser utilizada regularmente em monitoramentos ambientais.

A realização de outros ensaios também deve ser feita para gerar uma maior confiabilidade nos resultados de tributilestanho e trifenilestanho para que estes contribuam para a elaboração de uma nova resolução com base em espécies nativas e limites condizentes com a realidade brasileira.

7. REFERÊNCIAS

ABESSA, D. Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos. -290. 2002. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ABNT/15308. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Misidáceos (Crustacea). 15308. 2005.

ALMEIDA, E., DIAMANTINO, T. C., e DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings** 59[1], 2-20. 2-4-2007.

ALZIEU, C. Impact of tributyltin on marine invertebrates. **Ecotoxicology** 9[1-2], 71-76. 2000.

ALZIEU, C., HERAL, M., THIBAUD, Y., DARDIGNAC, M., e FEUILLET, M. Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huitre *Crassostrea gigas*. **Rev.Inst.Pêches Maritime** 45[2], 101-116. 1982.

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

APPEL, K. E. Organotin compounds: Toxicokinetic aspects. **Drug Metabolism Reviews** 36[3-4], 763-786. 2004.

AXIXAK et al. Evaluation of environmental levels and biological impact of TBT in Malta (central Mediterranean). **The Science of the Total Environment**. 89-97. 2000.

AZEVEDO F.A. e CHASIN A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. -340. 2004. São Carlos/São Paulo, Rima.

BARNES, R. Zoologia dos Invertebrados. 6, -1028. 1996a. São Paulo, Roca.

BARNES, R. Zoologia dos Invertebrados. 1996b. São Paulo, ROCA.

BEAUMONT, A. R. e BUDD, M. D. High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. **Marine Pollution Bulletin** 15[11], 402-405. 1984.

BRYAN, G. M. e LANGSTON, W. J. Bioavailability, Accumulation and Effects of Heavy Metals in Sediments With Special Reference to United Kingdom Estuaries: a Review. **Environmental Pollution** 76, 89-131. 1992.

CASTRO, I. B., RODRIGUES-QUEIROZ, L., e ROCHA-BARREIRA, C. A. Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha - uma Revisão. **Arquivos de Ciências do Mar** in press. 2006.

CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment** 258[1-2], 21-71. 21-8-2000.

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

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

CHI, T.H. The study of the distribution of organotin in the Love River in Kaohsiung. **Institute of Marine Resources, National Sun Yat-sen University, Master Thesis**, 92 pp. 2004

CIMA, F., BALLATIN, L., BRESSA, G., MATINUCCI, G., e BURIGHEL, P. Toxicity of Organotin Compounds on Embryos of a Marine Invertebrate (*Styela plicata*; Tunicata). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 35, 174-182. 1996a.

CIMA, F., BALLATIN, L., BRESSA, G., e SABBADIN, A. Immunotoxicity of butyltins in tunicates. **Applied Organometallic Chemistry** 9, 567-572. 1996b.

CLARK, E. L., STERRIT, R. M., e LESTER, J. N. The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment - a Look at the Data. **Environmental Science and Technology** 22[6], 600-604. 1988.

CONAMA. 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. 357, 58-63. 2005. Brazil, Diário Oficial da União.

DAVIES, I. M. e MCKIE, J. C. Accumulation of total tin and tributyltin in muscle tissue of farmed Atlantic salmon. **Marine Pollution Bulletin** 18[7], 405-407. 1987.

DIMITRIOU, P., CASTRITSI-CATHARIOS, J., e MILIOU, H. Acute toxicity effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride on gilthead seabream, *Sparus aurata* L., embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 54[1], 30-35. 2003b.

DIMITRIOU, P., CASTRITSI-CATHARIOS, J., e MILIOU, H. Acute toxicity effects of tributyltin chloride and triphenyltin chloride on gilthead seabream, *Sparus aurata* L., embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 54[1], 30-35. 2003a.

DOWSON, D. H., BUBB, J. M., e LESTER, J. N. A Study of the Partitioning and Sorptive Behavior of Butyltins in the Aquatic Environment. **Applied Organometallic Chemistry** 7, 623-633. 1996.

EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. -275. 2002. Environmental Protection Agency.

EVANS, S. M. TBT or not TBT?: that is the Question. **Biofouling** 14[2], 117-129. 1999.

GODOI, A. F. L., FAVORETO, R., e SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos. **Química Nova** 26[5], 708-716. 2003.

GOODING, M., GALLARDO, C., e LEBLANC, G. Imposex in Three Marine Gastropod Species in Chile and Potential Impact on Muriciculture. **Marine Pollution Bulletin** 38[12], 1227-1231. 1999.

GOODMAN, L., CRIPE, G. M., MOODY, P. H., e HALSELL, D. G. Acute toxicity of Malathion, Tetrabromobisphenol - A, and Tributyltin Chloride to Mysids (*Mysidopsis bahia*) of three Ages. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 41, 746-753. 1988.

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

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., e THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology** 11, 714-719. 1977.

HORIGUCHI, T., KOJIMA, M., KAYA, M., MATSUO, T., SHIRAIISHI, H., MORITA, M., e ADACHI, Y. Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*. **Marine Environmental Research** 54[3-5], 679-684. 2002.

IHARA, P. M. Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida. -86. 2008. Universidade Federal de Rio Grande.

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

LEE et al. Organotin contamination in fishes with different living patterns and its implications for human health risk in Taiwan. **Environmental Pollution**.137, 198-208. 2005

KAN-ATIREKLAP, S., TANABE, S., SANGUANSIN, J., TABUCANON, M. S., e HUNGSPREUGS, M. Contamination by butyltin compounds and organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand coastal waters. **Environmental Pollution** 97[1/2], 79-89. 1997.

KOBAYASHI, N. e OKAMURA, H. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. **Marine Pollution Bulletin** 44, 748-751. 2002.

KWOK, K. W. H. e LEUNG, K. M. Y. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. **Marine Pollution Bulletin** 51[8-12], 830-837. 2005.

KUEH e LAM. Monitoring of toxic substances in the Hong Kong marine environment. **Marine Pollution Bulletin**.744-757.2008.

LIU, L. L., CHEN, S. J., PENG, W. Y., e HUNG, J. J. Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. **Environmental Pollution** 98[1], 113-118. 1997.

LUDGATE, J. Economic and Technological Impact of TBT Legislation on the USA Marine Industry. **Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference**. 4, 1309-1313. 1987.

MARIN, M. G., MOSCHINO, V., CIMA, F., e CELLI, C. Embryotoxicity of butyltin compounds to the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Marine Environmental Research** 50, 231-235. 2000.

MORA, S. J. e PHILLIPS, D. R. Tributyltin (TBTt) pollution in riverine sediments following a spill from a timber treatment facility in Henderson, New Zealand. **Environmental Technology** 18, 1187-1193. 1997.

NASCIMENTO, I. A., SOUSA, C. M., e NIPPER, M. Métodos em Ecotoxicologia Marinha. 1, -262. 2002. São Paulo, Artes Gráficas.

OHJI, M., ARAI, T., e MIYAZAKI, N. 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. 2002a.

OHJI, M., ARAI, T., e MIYAZAKI, N. Acute toxicity of tributyltin to the Caprellidea (Crustacea: Amphipoda). **Marine Environmental Research** 59[3], 197-201. 2005.

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

OYEWO, E. O. Organotin compounds, fouling and the marine environment. **Ocean & Shoreline Management** 12, 285-294. 1989.

PAUL, J. D. e DAVIES, I. M. Effects of copper and tin-based anti-fouling compounds on the growth of scallops *Pecten maximus* and oysters *Crassostrea gigas*. **Aquaculture** 54[3], 191-203. 1986.

PRUDENTE, M., CHIHASHI, H., KAN-ATIREKLAP, S., IWATA, H., e TANABE, S. Butyltins, organochlorines and metal levels in green mussel, *Perna viridis* L. from the coastal waters of the Philippines. **Fisheries Science** 65[3], 441-447. 1999.

RACHID, B. R. F. Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos. -106. 1996. Universidade de São Paulo.

RUIZ, J. M., BACHELET, G., CAUMETTE, P., e DONARD, O. F. X. Three decades of tributyltin in the coastal Environment with emphasis on Archacon Bay, France. **Environmental Pollution** 93[2], 195-203. 1996.

SCHATZBERG, P. Organotin Antifouling Hull Paints and the U.S. Navy - A Historical Perspective. **Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference**. 4, 1324-1333. 1987.

SCHWARZENBACH, R. P., GSCHWEND, P. M., e IMBODEN, D. M. Environmental Organic Chemistry. 1994. New York, Wiley Interscience.

SHIM, W. J., HONG, S. H., KIM, N. S., YIM, U. H., LI, D., e OH, J. R. Assessment of butyl- and phenyltin pollution in the coastal environment of Korea using mussels and oysters. **Marine Pollution Bulletin** 51[8-12], 922-931. 2005.

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

STEPHENSON, M. D., SMITH, D. R., GOETZL, J., ICHIKAWA, G., e MARTIN, M. 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. 1986.

SWENNEN, C., RUTTANADAKUL, N., ARDSEUNGNERN, S., SINGH, H. R., MENSINK, B. P., e TEN HALLERS-TJABBES, C. C. Imposex in sublittoral and littoral gastropods from the Gulf of Thailand and strait of Malacca in relation to shipping. **Environmental Technology** 18[12], 1245-1254. 1997.

TEN HALLERS-TJABBES, C. C. Tributyltin and policies for antifouling. **Environmental Technology** 18[12], 1265-1268. 1997.

VAN WEZEL, A. P. e VAN VLAARDINGEN, P. Environmental risk limits for antifouling substances. **Aquatic Toxicology** 66[4], 427-444. 10-3-2004.

WALDOCK, M. J., THAIN, E. J., e WAITE, M. E. An assessment of the value of shell thickening in *Crassostrea gigas* as an indicator of exposure to tributyltin. *Organotin*. 220-237. 1995.

WALDOCK, R., REES, H. L., MATTHIESSEN, P., e PENDLE, M. A. Survey of benthic of the Crouch estuary (U.K.) in relation to TBT contamination. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** 79, 225-232. 1999.