Dayana Moscardi dos Santos

Compostos butílicos de estanho em tecidos de bagres estuarinos (Siluriformes, Ariidae) da costa sul e sudeste brasileira: monitoramento e toxicidade.

-Versão Corrigida-

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, programa de Oceanografia, área de Oceanografia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosalinda Carmela Montone

São Paulo
2012

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Compostos butílicos de estanho em tecidos de bagres estuarinos (Siluriformes, Ariidae) da costa sul e sudeste brasileira: monitoramento e toxicidade.

-Versão Corrigida-

Dayana Moscardi dos Santos

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de doutor em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica.

Julgada em __/__/____, por

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Aos meus pais Adelaide e Laertes e meu
irmão Diego, com todo amor, dedico.

***“...O homem não tece a teia da vida;
Ele é apenas um fio.
Tudo que faz à teia,
ele faz a si mesmo”.***

Ted Perry, *apud* Fritjof Capra

Sumário

Agradecimentos	viii
Resumo	x
Abstract	xi
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xvi
Introdução geral	1
Capítulo I – Compostos Butílicos de Estanho	3
1. Introdução	4
2. Propriedades	5
3. Aplicações	6
4. Ações regulatórias	8
5. Comportamento e distribuição em sistemas aquáticos	10
6. Biodisponibilidade e assimilação	16
7. Toxicidade	19
Capítulo II – Análise de BTs em matrizes ambientais	21
1. Introdução	22
2. Revisão de Literatura	23
2.1.Extração	24
2.2.Derivação	25
2.3.Purificação dos extratos – “Clean-up”	26
2.4.Sistemas analíticos	28
2.4.1. GC-PFPD	28
2.5.Procedimentos de validação	30
2.6.Avaliação do efeito matriz	32
3. Objetivos	34
3.1.Objetivo geral	34
3.2.Objetivos específicos	34
4. Materiais e Métodos	35
4.1.Padrões analíticos, solventes e reagentes	35
4.2.Limpeza da vidraria e descarte de resíduos	35
4.3.Sistema analítico e condições cromatográficas	36
4.4.Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração	37

4.5.Surrogate e padrão interno.....	38
4.6.Método para a análise de BTs em sedimentos e MPS.....	38
4.7.Método para a análise de BTs em tecidos de bagres estuarinos.....	40
4.8.Limites de detecção e quantificação do sistema.....	41
4.9.Precisão e exatidão	42
4.10 Limites de detecção e quantificação dos métodos	42
4.11. Avaliação do efeito matriz	43
5. Resultados e Discussões	45
5.1. Linearidade, curva de calibração e liites do sistema analítico	45
5.2. Precisão e exatidão do método.....	47
5.2.1. Sedimentos.....	47
5.2.2. Tecidos.....	52
5.3. Estudo do efeito matriz sobre a resposta do sistema analítico.....	55
5.3.1. Sedimentos.....	56
5.3.2. Tecidos de <i>C. spixii</i>	58
6. Considerações do Capítulo II.....	62
Capítulo III – Distribuição e comportamento dos BTs em estuários	63
1. Introdução	64
2. Revisão de literatura	66
2.1.Estuários	66
2.2.Peixes como biomonitores.....	68
2.3.Bagres	70
2.3.1. <i>Cathorops spixii</i> (Agassiz, 1829)	71
2.3.2. <i>Aspistor luniscutis</i> (Valenciennes, 1840)	72
2.3.3. <i>Genidens genidens</i> (Cuvier, 1829)	73
2.4.Interações ecológicas entre as espécies estudadas.....	74
3. Objetivos.....	76
3.1.Objetivo geral	76
3.2.Objetivos específicos.....	76
4. Materiais e métodos.....	77
4.1.Amostragem	77
4.2.Áreas de estudo.....	79
4.2.1. Itajaí-SC.....	79
4.2.2. Baía da Babitonga-SC	81

4.2.3. Baía de Guaratuba-PR	83
4.2.4. Baía de Paranaguá-PR	84
4.2.5. Cananéia-SP	86
4.2.6. Santos-SP.....	87
4.2.7. Baía de Sepetiba-RJ.....	89
4.2.8. Itapemirim-ES	91
4.3. Granulometria e teor de matéria orgânica	92
4.4. Análise elementar	93
4.5. Análise de BTs	93
4.6. Análise dos dados	93
5. Resultados e Discussões.....	94
5.1. Itajaí-SC.....	98
5.2. Baía da Babitonga-SC	101
5.3. Baía de Guaratuba-PR	103
5.4. Baía de Paranaguá-PR	105
5.5. Cananéia-SP	107
5.6. Santos-SP.....	108
5.7. Baía de Sepetiba-RJ.....	110
5.8. Itapemirim-ES	111
5.9. Comportamento dos BTs nos compartimentos estuarinos investigados	112
5.10. Assimilação de BTs entre as espécies estudadas	115
5.11. Impacto dos BTs nos estuários investigados	123
6. Considerações do Capítulo III.....	131
Capítulo IV – Uso de biomarcadores no fígado do bagre <i>Cathorops spixii</i> amostrado na Baía de Paranaguá-PR.....	132
1. Introdução	133
2. Revisão de literatura	134
2.1. Biomarcadores	137
2.1.1. Genéticos	138
2.1.2. Bioquímicos.....	139
2.1.3. Morfológicos	142
2.1.4. Dosagem de HPAs na bile	143
3. Objetivos.....	145
3.1. Objetivo geral	145

3.2.Objetivos específicos	145
4. Materiais e métodos.....	146
4.1.Amostragem	146
4.2.Quantificação dos BTs.....	148
4.3.Genotoxicidade	148
4.4.Enzimas	149
4.5.Histopatologia.....	150
4.6.Fator de condição.....	151
4.7.Dosagem de HPAs na bile	151
4.8.Tratamento estatístico.....	152
5. Resultados e Discussões.....	153
5.1.Quantificação de BTs	153
5.2.Enzimas	156
5.3.Dosagem de HPAs na bile	160
5.4.Histopatologia.....	162
5.5.Genotoxicidade.....	165
5.6.Fator de condição.....	167
5.7.Resultados integrados	168
6. Considerações do Capítulo IV	176
Conclusões gerais e perspectivas futuras.....	178
Referências	181
Apêndices.....	223

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho só foi possível a partir da colaboração e apoio expressos sobre diferentes formas. Assim, agradeço:

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização desta pesquisa e contribuição para minha formação profissional.

À Capes e ao CNPq pelas bolsas de estudo e à FACTE pelo suporte financeiro.

À prof^a. Rosalinda Carmela Montone (Rosa) pela orientação, incentivo e todo o suporte oferecido para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido. Agradeço a compreensão por eu estar na maior parte do tempo distante assim como o carinho e atenção recebidos quando estive por perto.

Ao prof. Alexander Turra, pela co-orientação científica, discussões e pelos conselhos, sempre me apoiando e auxiliando a crescer profissional e pessoalmente.

À prof^a. Mary Rosa, pela amizade, carinho e todo o incentivo recebido. Agradeço seus conselhos, sua atenção, colaboração e cuidado durante todo o período em que estive em Araraquara. Obrigada pela confiança... por sempre acreditar em mim!

Aos colegas do Labqom, Satie, Lorival, Silvio, Elvis, Amanda, Ana Cecília, Caio Augusto, Caio Vinicius, Diego, Felipe, Fernanda, Josi, Ju, Hileia, Mauro, Patrícia, Patrick, Renato, Vinícius e aos professores Marcia Bicego e Rolf Weber pela agradável convivência no período em que estive em São Paulo e pelos deliciosos almoços e comemorações!

Ao Dalton Sasaki pela confecção dos mapas e ao Tomás pela análise de granulometria e matéria orgânica dos sedimentos.

Aos colegas do GRESCO, Claudia F., Claudia P., Débora, D. Marilei, Demétrio, Diógenes, Flávio, Joyce (Fanta), Lucy, Nathalie, Gisele, Guilherme, Ovídio, Patrícia, Pedro, Marcos (Pipoca), Renato (Zé), Stephane e William por toda a ajuda, companheirismo e diversão dentro e fora do laboratório!

Aos colegas da UFPR, Gustavo, Flavia, Cris, Manu e Laerte, por toda a ajuda na realização das análises em Curitiba e aos professores Marta Margarete Cestari, Ciro

Oliveira Ribeiro e Helena Assis pela oportunidade de parceria e conhecimentos adquiridos.

A Ana Paula, Silvana, Wagner, e a todos os funcionários do IO-USP, pela assistência durante o projeto.

Ao Bruno, pela amizade, companheirismo e apoio durante todo o projeto...sua ajuda foi fundamental! Às meninas de IC Sara e Dani pelo carinho e toda a ajuda no laboratório. A Mercia, por sua parceria e amizade dentro e fora do laboratório.

A querida amiga Ana Flávia, pelo apoio e incentivo de sempre... obrigada pelos conselhos e por ter proporcionado a possibilidade de fazer o que eu amo!

Às amigas Karla e Karina (Arms) pela amizade sincera... obrigada por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e compartilhando todos os momentos! À Pri, Val, Lu e Lívia pelos momentos felizes de convivência nas repúblicas em Araraquara e em São Paulo.

A minha família, base da minha vida, que me fortalece e que me dá razão para lutar! Amo muito vocês...

Ao Dan, meu rapaz... obrigada por seu amor e companheirismo...sem você nada disso seria possível! Agradeço muito por ter você na minha vida!

A Deus, por seu infinito e soberano amor...

Muito obrigada!!

Resumo

Compostos butílicos de estanho (BTs) estão na lista dos contaminantes impactantes relacionados ao ambiente marinho. Sua ampla distribuição associada à elevada toxicidade faz com que o monitoramento desses compostos no ambiente costeiro seja de fundamental importância. A ocorrência de BTs foi verificada em sedimentos superficiais, material particulado em suspensão e nos tecidos (fígado e brânquias) de três espécies de bagres estuarinos: *Cathorops spixii*, *Aspistor luniscutis* e *Genidens genidens*; amostrados em 8 estuários da região sul e sudeste brasileira. As análises foram realizadas através de GC-PFPD, seguindo padrões de controle de qualidade analítico e onde foi constatada a ocorrência de efeito matriz sobre o sistema analítico a partir da quantificação das amostras de tecido. Dentre os estuários amostrados, verificou-se um maior impacto dos BTs sobre os sistemas estuarinos de Paranaguá e Itajaí, em decorrência da presença destes compostos em todos os compartimentos ambientais analisados. As três espécies investigadas puderam ser consideradas como biomonitoras da presença de BTs no ambiente, uma vez que são passíveis de assimilação destes compostos, mesmo em organismos amostrados em regiões distantes de potenciais fontes de entrada. Os efeitos sobre a fisiologia de *C. spixii* amostrado em Paranaguá também foi investigada a partir do uso de biomarcadores no fígado desses organismos, constatando um impacto associado à presença destes contaminantes no sistema.

Palavras-chave: BTs, GC-PFPD, bagres, estuários, biomarcadores.

Abstract

Butyltin compounds (BTs) are in the list of related contaminants striking marine environment. Their widespread distribution associated with high toxicity causes the monitoring of fundamental importance. The occurrence of BTs were checked through superficial sediments, suspended particulate matter and tissues (liver and gill) analysis on three estuarine catfishes: *Cathorops spixii*, *Aspistor luniscutis* e *Genidens genidens*; sampled in eight estuaries from Brazilian south and southeast coast. Analysis were carried by GC-PFPD, following quality control procedures, where was verified the presence of matrix effect over the system from tissues quantification. Among estuaries, the major impact was found in Paranaguá-PR and Itajaí-SC, due the presence of these compounds in all investigated compartments. These three catfish species have shown good biomonitors of BTs presence once were liable of uptake, even in groups sampled far from potential BTs sources. The effects over *C. spixii* physiology were also checked in Paranaguá from the use of biomarkers on liver of these organisms, noting the impact related with the presence of these compounds on the system.

Keywords: BTs, GC-PFPD, catfishes, estuaries, biomarkers.

Índice de Figuras

Figura I.1. Principais processos envolvidos na distribuição dos BTs no ambiente aquático. Adaptado de Yamamoto et al. (2009)	11
Figura I.2. Conceito simplificado da acumulação de contaminantes em peixes. Adaptado de Newman (2001).....	18
Figura II.1. Desenho esquemático do detector fotométrico de chama pulsante (PFPD). Adaptado de Amirav e Jing (1995)	30
Figura II.2. Cromatograma obtido na injeção de padrões (nível 10) de BTs por GC-PFPD.....	37
Figura II.3. Método utilizado para a análise de BTs em sedimentos superficiais e material particulado em suspensão (GODOI et al., 2003a,b).....	39
Figura II.4. Comparação do método utilizado por Limaverde et al. (2007) e o dele adaptado par a análise de BTs em tecidos de bagres estuarinos.....	41
Figura II.5. Teste de Huber para a avaliação da linearidade do sistema analítico para BTs	45
Figura II.6. Cromatogramas (GC-PFPD) obtidos na análise de amostra de sedimentos de São Vicente-SP. (A) amostra fortificada; (B) amostra testemunha	47
Figura II.7. Cromatogramas (GC-PFPD) indicando a presença de picos interferentes na matriz (amostra de São Vicente-SP). Em destaque: formas características dos picos cromatográficos, para a diferenciação entre o pico de compostos de estanho e pico interferente (compostos sulfurosos)	48
Figura II.8. Cromatogramas (GC-PFPD) da amostra fortificada com BTs antes (A) e após (B) o tratamento com cobre ativado	50
Figura II.9. Cromatogramas (GC-PFPD) da amostra fortificada com TBT e TPrT com diferentes “gates”. (A) “gate” 1, corresponde aos valores de “gates” utilizados no método (3.0ms para “delay” e “width”) e (B) “gate” 2, novos valores empregados (5.0 e 4.0ms para “delay” e “width” respectivamente).....	51
Figura II.10. Cromatogramas (GC-PFPD) obtidos na análise do efeito matriz: (A) padrões dos BTs em solvente (hexano); (B) padrões dos BTs em extrato de sedimento; (C) padrões dos BTs em extrato de fígado; (D) padrões dos BTs em extrato de brânquias.....	56
Figura II.11. Curvas de calibração obtidas na matriz e no solvente. (A) TBT; (B) DBT; (C) MBT; (D) TPrT	57

Figura II.12. Curvas analíticas (área/PIArea x concentração) obtidas para o solvente, brânquias e fígado de <i>Cathorops spixii</i> : (A) TBT; (B) DBT; (C) MBT; (D) TPrT	59
Figura II.13. Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente e no extrato da matriz (tecidos de <i>C. spixii</i>): (A) fígado; (B) brânquias. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.	60
Figura III.1. <i>Cathorops spixii</i>	72
Figura III.2. <i>Aspistor luniscutis</i>	73
Figura III.3. <i>Genidens genidens</i>	74
Figura III.4. Localização dos 8 estuários da costa sul e sudeste brasileira investigados neste trabalho.	77
Figura III.5. Estuário do Itajaí-Açu-SC e os pontos de amostragem: ITA 1 localizado nas proximidades de estaleiros e marinas; Ponto 2 próximo ao Porto de Itajaí; Ponto ITA3 próximo à estaleiros.	81
Figura III.6. Baía da Babitonga-SC e os pontos de amostragem: BAB 1 localizado na face oposta do Porto de São Francisco do Sul (SFS); Ponto BAB 2 próximo ao Porto de SFS; Ponto BAB3 próximo ao Porto de Itapoá....	82
Figura III.7. Baía de Guaratuba-PR e os pontos de amostragem: GTB 1 localizado na Barra do Boguaçu; Ponto GTB2 Poço do Araguangá; Ponto GTB3 próximo ao trapiche da cooperativa de pescadores	83
Figura III.8. Complexo Estuarino de Paranaguá-PR e os pontos de amostragem: PNG1 localizado na porção NO da Ilha do Mel; Ponto PNG2 localizado na Baía das Laranjeiras, próxima à Ilha das Peças; Ponto PNG3 próximo ao Porto de Paranaguá...	85
Figura III.9. Estuário de Cananéia-SP e os pontos de amostragem: CAN1 localizado na Ilha do pai do Mato; Ponto CAN 2 localizado no Boguaçu; Ponto CAN3 próximo à saída para a Ilha do Cardoso.....	86
Figura III.10. Estuário de Santos-SP e os pontos de amostragem: STO1 nas proximidades do Porto de Santos e Ferry boat; STO2 localizado próximo à Ilha dos Bagres-Alemao-Transpetro; Ponto STO3 próximo à Ilha Barnabé.....	89
Figura III.11. Baía de Sepetiba-RJ e os pontos de amostragem: SEP1 nas proximidades do Porto Oposto; SEP2 localizado próximo ao Porto de Itaguaí; Ponto SEP3 próximo à saída do Rio Guandu....	90
Figura III.12. Delta do Itapemirim-ES e os pontos de amostragem: IPM1 entrada da Barra; IPM2 localizado no Cabral do meio; Ponto IPM3 no Cabral pilastra.....	92
Figura III.13. Concentrações máximas (ng g^{-1}) de BTs detectadas no fígado dos bagres por estuário.	115

Figura III.14. Distribuição dos BTs nos sistemas estuarinos analisados. Baseado nos resultados obtidos neste trabalho e em Hoch (2001).	122
Figura III.15. Concentrações máximas de BTs encontradas em sedimentos superficiais no Brasil. Em asterisco: amostras analisadas neste trabalho.	127
Figura IV.1. Biossíntese de hormônios esteróides e interferência do TBT no sistema. Adaptado de Souza (2004)..	135
Figura IV.2. Biotransformação do TBT em peixes. Adaptado de Hansen (2003).....	141
Figura IV.3. Estrutura dos 16 HPAs prioritários determinados pela USEPA, Fonte: Stefens (2006).....	143
Figura IV.4. Pontos de amostragem de <i>C. spixii</i> para a análise de toxicidade na Baía de Paranaguá, PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço..	147
Figura IV.5. Valores de atividade da EROD e GST dosados no fígado do bagre <i>C. spixii</i> : (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço... ..	156
Figura IV.6. Dosagem de LPO no fígado de <i>C. spixii</i> amostrados em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço..	159
Figura IV.7. Concentrações de HPAs por anéis aromáticos, detectadas na bile de <i>C. spixii</i> amostrados em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço. Em detalhe: concentração média do Σ HPAs..	160
Figura IV.8. Secção transversal do fígado de <i>C. spixii</i> corado com HE. (A) ML e infiltração leucocitária. Em detalhe: CMM; (B) Necrose e presença de parasitas. Barra: escala 50 μ m..	162
Figura IV.9. Índice de lesões obtidos através do I_{org} de Bernet et al. (1999) e ocorrência média de CMM/ML no fígado de <i>C. spixii</i> amostrados em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.....	163
Figura IV.10. Escores do ensaio cometa obtidos em hepatócitos de <i>C. spixii</i> amostrados em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.....	166
Figura IV.11. Análise de componentes principais (PCA) envolvendo biomarcadores e concentrações de BTs no bagre <i>C. spixii</i> amostrados em Paranaguá-PR.....	172
Figura IV.12. Efeitos tóxicos atribuídos ao TBT em peixes (bioensaios) mediante as concentrações desse composto detectado em <i>C. spixii</i> : A. Redução do número de espermatozoides em <i>Scophthalmus maximus</i> com 25 ng g ⁻¹ (Gosz et al., 2011b); B. necrose e vacuolização em <i>Hippoglossoides platessoides</i> com 30 ng g ⁻¹ (Oliveira Ribeiro et al., 2009); C. LOAEL com 40 ng g ⁻¹ (WHO, 1990); D. degeneração nuclear de hepatócitos de <i>Hoplias malabaricus</i> com 68 ng g ⁻¹ (Oliveira Ribeiro et al., 2002); E. necrose em <i>Hoplias malabaricus</i> com 300 ng g ⁻¹ (Rabitto et al., 2005)....	174

Índice de Tabelas

Tabela I.1. Propriedades físico químicas dos BTs	6
Tabela I.2. Principais aplicações comerciais dos compostos butílicos de estanho	7
Tabela II.1. Condições cromatográficas do CG-PFPD	36
Tabela II.2. Concentrações de BTs dentro da faixa de trabalho	38
Tabela II.3. Tempo de retenção (t_R), faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) obtidos na curva de calibração dos BTs (n=3).	45
Tabela II.4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais, obtidos para o sistema GC-PFPD utilizado neste trabalho. Expressos em pg	46
Tabela II.5. Resultados de recuperação obtidos com o método para o material de referência certificado (PACS-2). Expressos em g kg ⁻¹ (n=9).....	47
Tabela II.6. Resultados obtidos na utilização de “clean-up” <i>in situ</i> com cobre metálico em amostra fortificada (n=3).	50
Tabela II.7. Resultados de recuperação obtidos com o método para o material de referência certificado ERM-CE477. Expressos em mg kg ⁻¹ (n=3).....	52
Tabela II.8. Porcentagem de recuperação de BTs e CV(%) obtidos para o fígado e brânquias das três espécies investigadas neste estudo (n=9).	53
Tabela II.9. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o método proposto na análise de BTs em peixes. Expressos em ng g ⁻¹ (w.w.).....	54
Tabela II.10. Limites de detecção (LD) de estudos envolvendo a análise de TBT em peixes.....	54
Tabela II.11. Equações e coeficientes de correlação (r^2) obtidos a partir da construção da curva analítica no solvente e na matriz (sedimento). n=7... ..	57
Tabela II.12. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método, para sedimento e material particulado em suspensão (MPS). Expressos em ng g ⁻¹	58
Tabela II.13. Equações e coeficientes de correlação (r^2) obtidos a partir da construção da curva analítica no solvente e na matriz (fígado e brânquias). n=5... ..	59
Tabela III.1. Parâmetros amostrais de água, sedimento e bagres estuarinos nos locais estudados... ..	78
Tabela III.2. Resultados obtidos na análise elementar e granulometria dos sedimentos superficiais amostrados nos 8 estuários investigados.....	95

Tabela III.3. Resultados obtidos na análise de BTs em sedimentos superficiais e material particulado em suspensão (n=3).....	96
Tabela III.4. Resultados obtidos na análise de BTs no fígado e brânquias de bagres estuarinos amostrados (n=10).....	97
Tabela III.5. Concentrações de BTs em tecidos de peixes amostrados em diversos países.....	118
Tabela III.6. Número de pontos amostrais (n) onde foram encontradas as espécies nos estuários investigados e concentrações médias de BTs obtidas entre elas. Resultados expressos em $\text{ng g}^{-1}(\text{w.w})$	119
Tabela III.7. Concentrações de BTs encontradas em sedimentos superficiais em outros países	125
Tabela IV.1. Dados biométricos dos exemplares de <i>C. spixii</i> amostrados na Baía de Paranaguá-PR.	147
Tabela IV.2. “Pool” das amostras de fígado de <i>C. spixii</i> identificadas para a análise de BTs: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.	148
Tabela IV.3. Comprimento de onda específico para cada composição aromática dos HPAs.....	151
Tabela IV.4. Quantificação de BTs em amostras de <i>C. spixii</i> amostradas na Baía de Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço. Resultados expressos em $\text{ng g}^{-1}(\text{w.w.})$	153
Tabela IV.5. Incidência de lesões e sua porcentagem em indivíduos de <i>C. spixii</i> amostrados em Paranaguá-PR.	162
Tabela IV.6. Índice de correlação de Spearman ($p<0,05$) correlacionando biomarcadores e as concentrações de BTs mensurados no bagre <i>C. spixii</i> em Paranaguá-PR. Em negrito: correlação moderadamente significativa; sublinhado: correlação fortemente significativa.....	169

Introdução Geral

Organismos, populações e biocenoses assim como todo o ecossistema são naturalmente influenciados por diversos fatores de estresse bióticos e abióticos tais como flutuações no clima, radiação, disponibilidade de alimento, interações presa-predador, parasitas, doenças e competição entre as espécies. No entanto, atividades humanas também possuem uma grande influência no impacto dessas comunidades resultante da entrada constante de contaminantes, transformando o processo evolutivo em uma situação de total desequilíbrio, onde regiões impactadas tornam-se as grandes responsáveis pela diminuição na taxa de riqueza e diversidade de espécies (GENTEN et al., 2009).

O ambiente aquático, receptor final deste impacto, está constantemente exposto através da introdução de diversos compostos inorgânicos e orgânicos liberados a partir de efluentes industriais e urbanos. Estes compostos, também denominados xenobióticos incluem as bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados (OCPs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dibenzo p-dioxinas (PCDDs), difenil-éteres polibromados (PBDEs), alquilfenóis, ftalatos, compostos farmacêuticos tais como estrogênios sintéticos e produtos de cuidado pessoal (VAN der OOST et al., 2003; BILA e DEZOTTI, 2007) além de compostos organometálicos, formados a partir de metais (ou metalóides) ligados covalentemente a um ou mais radicais orgânicos (CHAMP e SELIGMAN, 1996) nos quais estão inclusos os compostos orgânicos de estanho (OTs). Na classe dos OTs estão os compostos butílicos de estanho (BTs) amplamente utilizados e estudados.

Neste trabalho serão abordados estudos analíticos, ambientais e toxicológicos envolvendo BTs tendo como principal foco a utilização de bagres (Siluriformes, Ariidae), investigados como biomonitores da contaminação por esses compostos e evidenciada em estuários da costa brasileira. Assim, os capítulos foram distribuídos da maneira descrita a seguir.

No **Capítulo I** serão abordadas as principais características relacionadas aos compostos butílicos de estanho assim como o grupo a que pertencem (os OTs), onde serão discutidas informações a respeito de suas aplicações industriais, distribuição no ambiente, toxicidade e ações regulatórias em vigência para esses compostos de forma a introduzir o contexto abordado nos capítulos posteriores.

No **Capítulo II** será discutida a aplicação de um método para a análise de BTs em tecidos de bagres estuarinos, assim como a utilização de ferramentas de controle de qualidade analítico tais como a análise de efeito matriz em peixes e sedimentos, que possam garantir a confiabilidade dos resultados gerados neste estudo.

Em seguida, no **Capítulo III**, será apresentado o estudo da ocorrência de BTs em sedimentos, material particulado em suspensão (MPS) e tecidos de bagres estuarinos amostrados em 8 estuários ao longo da costa sul e sudeste brasileira onde serão apontadas fontes potenciais de entrada desses compostos no ambiente estuarino assim como o fracionamento dentre os compartimentos ambientais investigados.

Por fim, no **Capítulo IV**, estão apresentados os resultados obtidos no estudo da toxicidade dos BTs em amostras de *C. spixii* provenientes da Baía de Paranaguá-PR e a utilização de biomarcadores associados à quantificação destes compostos no fígado desses organismos.

Capítulo I – Compostos Butílicos de Estanho

1. Introdução

Os compostos orgânicos de estanho e, mais especificamente o tributilestanho (TBT) foram considerados durante muitos anos como um dos compostos mais tóxicos já introduzidos no ambiente marinho através das atividades humanas (WANG et al., 2008). Sua entrada, a partir da utilização como agente biocida em tintas anti-incrustantes, afetou comunidades biológicas inteiras principalmente relacionadas ao ambiente estuarino onde estão localizados grande parte dos portos, marinas e estaleiros, fontes potenciais de dispersão desse contaminante.

No ambiente, devido ao seu comportamento hidrofóbico, baixa solubilidade e volatilidade, o TBT é rapidamente adsorvido no material particulado da coluna d'água e sofre sedimentação, sendo os sedimentos considerados como principais reservatórios desse composto no ambiente aquático. Entretanto, devido ao hidrodinamismo e interações químicas e biológicas que ocorrem no meio aquático, o TBT pode ser transportado para outros locais, assim como sofrer debutilação transformando-se em dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT) ou mesmo advecção, tornando-se biodisponível para organismos pelágicos e bentônicos.

A assimilação dos BTs por organismos aquáticos depende da biodisponibilidade e está associada ao comportamento dos organismos no ambiente assim como a frequência de exposição. A bioacumulação dos BTs ocorre de acordo com a capacidade de assimilação, depuração/metabolização e eliminação desses contaminantes, sendo que efeitos tóxicos podem ser observados a partir do acúmulo mesmo em baixas concentrações.

A toxicidade do TBT vem sendo estudada há muitos anos sendo seu principal efeito sobre a biota constatado em moluscos, a partir da síndrome de alteração endócrina denominada imposex (FERNANDEZ et al., 2002). Além do imposex efeitos sobre os organismos aquáticos têm sido observados em todos os níveis de organização biológica, atingindo inclusive a ictiofauna e cadeia alimentar associada (LISCIO et al., 2009). Em decorrência de seus efeitos nocivos ao ambiente, em 2008 o TBT foi banido mundialmente, legislação ratificada por legislações específicas de cada país signatário. No entanto, mesmo após o banimento, os BTs continuam presentes no ambiente aquático seja através do uso indevido como agente anti-incrustante ou mesmo através do aporte de efluentes industriais e urbanos contendo o TBT ou seus produtos de degradação, tornando o risco para o sistema aquático um problema permanente.

2. Propriedades

Compostos orgânicos de estanho (OTs- do inglês *organotin*) estão entre os compostos organometálicos, formados a partir de um átomo de estanho (Sn) contendo ao menos uma ligação Sn-C (CHAMP e SELIGMAN, 1996; HOCH, 2001). A fórmula $R_nSnX_{(4-n)}$ é comumente designada para definir os OTs sendo R um grupo alquil ou aril, X correspondendo à íons tais como O^{2-} , OH^- , Cl^- , F^- , SH^- e n variando de 1 a 4 (HOCH, 2001; RÜDEL, 2003; STANISZEWSKA et al., 2008).

No ambiente marinho, os principais OTs encontrados referem-se aos compostos butílicos de estanho (BTs) e compostos fenílicos de estanho (PhTs). Os BTs compreendem o tributilestanho (TBT) e seus produtos de degradação dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT), focos do presente estudo.

Uma vez no ambiente aquático, os BTs podem interagir com matrizes bióticas e abióticas a partir de interações íon-dipolo, dipolo-dipolo, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). A solubilidade dos compostos butílicos de estanho é baixa, dependente do pH, força iônica e temperatura (RÜDEL, 2003) diminuindo com o aumento do comprimento da cadeia orgânica além de depender da espécie aniônica associada à molécula (OKORO et al., 2011). Também são considerados pouco voláteis, sendo essa condição dependente de fatores ambientais a que estão expostos (RÜDEL, 2003). Dependendo das condições ambientais podem existir no meio aquático como pares de íons neutros, complexos ou cátions (RÜDEL, 2003). O TBT é um composto ionizável e exibe um valor de pKa de 6,51 indicando que nesse pH metade das moléculas ocorrem na forma catiônica (TBT^+) e, no ambiente aquático forma complexos com diversos ânions incluindo hidróxidos, sulfatos e cloretos (MEADOR et al., 2002). Podem também ser encontrados na forma de óxidos (AL-RASHDI, 2011) sendo reportados como compostos relativamente estáveis.

As propriedades físico-químicas desses compostos são variáveis e importantes para a compreensão de sua distribuição, comportamento e persistência no ambiente. O número de ligações Sn-C é responsável pelas propriedades químicas e físicas dos BTs (HOCH, 2001) uma vez que a hidrofobicidade segue a ordem: $TBT > DBT > MBT$ (BLUNDEN, 1990). Na Tabela I.1 estão presentes as principais propriedades atribuídas aos BTs.

Tabela I.1. Propriedades físico químicas dos BTs.

	TBT	DBT	MBT
Estrutura			
Fórmula Molecular	(C ₄ H ₉) ₃ SnX	(C ₄ H ₉) ₂ SnX	(C ₄ H ₉)SnX
Massa Molar (g mol⁻¹)	325,51 ^a	303,84 ^a	282,18 ^a
Temp. de Fusão (°C)	-45 ^b	39-41 ^c	-63 ^d
Temp. de Ebulição (°C)	173 ^b	135 ^c	93 ^a
Densidade (g cm³)	1,21 ^c	1,4 ^c	1,69 ^a
Solubilidade (mg L⁻¹)	5-50 ^f	5-17 ^f	8,2 ^d
pK_a	6,51 ^f	s.d	s.d
K_{ow} (log K_{ow})	3,54 ^b	1,89 ^d	0,18 ^d
K_{oc} (log K_{oc})	4,5 ^h	3,35 ^d	1,76 ^d
Coef. de Partição K_D (L kg⁻¹)	1,1x10 ⁴ a 4,9x10 ^{5g}	8,5x10 ³ a 6,0x 10 ^{5g}	4,8x10 ³ a 1,3x10 ^{5g}

s.d sem determinação

^a SIGMA-ALDRICH, 2012^b WHO, 1999 água do mar^c HOCH, 2001^d DOBSON et al., 2006^e DAVIES, 2004.^f RÜDELI, 2003^g BERG et al., 2001- valores obtidos para sedimentos marinhos e portos^h MEADOR, 2002

3. Aplicações

Os OTs se tornaram conhecidos em 1852 quando Löwig preparou o primeiro destes compostos (EBDON et al., 1998) porém, tornaram-se importantes para a indústria apenas em 1940 (RÜDEL et al., 2003; MENG et al., 2009). A partir de então, esses compostos têm sido introduzidos no ambiente a partir de atividades humanas e possuem uma variedade de aplicações dependendo do número de ligações Sn-C (GODOI et al., 2003a; AL-RASHDI, 2011). Na Tabela I.2. estão presentes as principais aplicações dos compostos butílicos de estanho.

Tabela I.2. Principais aplicações comerciais dos compostos butílicos de estanho.

BT	Aplicação
MBT	Estabilizador de PVC
	Catalisador
	Precursor de SnO ₂ em tratamento de vidros
DBT	Estabilizador de PVC
	Catalisador de espumas de poliuretano e silicone
TBT	Tintas anti-incrustantes
	Preservativo de madeira e têxtil
	Tintas aquosas
	Indústria de papel
	Inseticida, fungicida, bactericida

Fonte: FENT, (2000); OKORO et al., 2011.

Acredita-se que 70% da produção atual de BTs seja aplicada na indústria de plásticos como estabilizante térmico além da produção de espumas de poliuretano e silicone. Isso porque o PVC se decompõe facilmente sob aquecimento (80-200°C) ou através da exposição à luz solar devido à perda do HCl do polímero. Como são utilizados como estabilizadores de PVC, os BTs podem então ser encontrados em tubulações, caixas d'água, estruturas de janelas e materiais de revestimento sendo que a lixiviação a partir desse material pode chegar a 1 mg (Sn) por m³ (OKORO et al., 2011). Um estudo envolvendo a determinação de BTs em embalagens de produtos comercializados em supermercados do Japão apontou a presença desses contaminantes em 50% das embalagens plásticas compostas por papel siliconizado, luvas de poliuretano, esponjas de louça e papel celofane que envolve os alimentos (TAKAHASHI et al., 1999). Na agricultura, a aplicação constante de pesticidas, a utilização de processos de irrigação ou mesmo o emprego de lodo de esgoto como aditivo de solo podem representar fontes de OTs para o ambiente, uma vez que podem conter estas substâncias em suas formulações (HEROULT et al., 2008).

Apesar dessa extensa aplicação comercial, a principal entrada dos OTs no ambiente marinho foi e ainda permanece associada ao uso das tintas anti-incrustantes sendo o TBT e o TPhT (trifenilestanho) os agentes biocidas à elas associados. Essas tintas são aplicadas em redes, bóias, plataformas e cascos de pequenas e grandes embarcações submersas ou que possuam algum contato com a água (seja ela dulcícola ou marinha) para evitar a formação de uma camada incrustante nessas superfícies. Esses

dois compostos trissubstituídos, principalmente o TBT, tiveram seu uso como anti-incrustantes rapidamente incrementado, devido a alta relação custo/benefício acreditando-se que na metade dos anos 1980 já eram utilizados em 80% das embarcações comerciais (AL-RASHDI, 2011).

As tintas a base de TBT podem ser de livre associação, onde são liberadas passivamente para a água por lixiviação ou ainda as denominadas “shelf polishing” compostas por polímeros de TBT e que possuem uma efetividade superior a 5 anos. Acredita-se que a taxa de liberação do TBT a partir de superfícies recentemente cobertas com a tinta é de cerca de $1,6 \mu\text{g (Sn) cm}^{-2}$ por dia sendo que uma embarcação comercial ancorada durante o período de 3 dias em um porto pode liberar até 200g de TBT na água de seu entorno (OKORO et al., 2011).

O acúmulo dessas incrustações tais como limo, algas e animais são desfavoráveis para as embarcações, pois aumentam a resistência dos cascos em contato com a água, diminuindo a velocidade da embarcação e aumentando, dessa forma, o consumo de combustível pelo menor rendimento. Além disso, podem também afetar a estrutura estática da embarcação comprometendo assim a segurança de seus tripulantes (TURNER, 2010).

Uma vez que a liberação dessas tintas para o ambiente aquático é contínua existe uma tendência maior de concentração dos contaminantes em ambientes semifechados tais como estuários (EBDON et al., 1998). Além disso, nessas regiões estão concentradas a maior parte dos portos, marinas e estaleiros, locais onde as embarcações podem permanecer por longos períodos e, conseqüentemente, concentrar uma maior quantidade desses contaminantes em seu entorno, que podem ser também provenientes de partículas de tinta disponibilizando concentrações ainda mais elevadas para o sistema (TURNER, 2010).

4. Ações Regulatórias

A proibição do uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT ocorreu em países da Europa e Ásia nas décadas de 1970-1980 (ALZIEU, 2000). Em 1990, a IMO (Organização Marítima Internacional) através da resolução A.982(22) sugeriu também a proibição destas tintas. Já no Brasil, em 1992 no Rio de Janeiro durante a Conferência UNCED (United Nations Conference on Environment and Development) conhecido também como Rio-92 o uso de substâncias perigosas em sistemas anti-incrustantes

também foi abordado e discutido (GIPPERT, 2009). Entretanto, foi em 2001 que a IMO estabeleceu uma convenção para o controle de sistemas anti-incrustantes nocivos em navios (AFS Convention) e determinou que o banimento mundial de tintas à base de TBT em embarcações ocorresse até o início de 2008 tendo o Brasil como um dos países signatários. No Brasil, a Marinha Brasileira banuiu o uso dessas tintas já no mesmo ano (2001), porém só em 2007 estabeleceu a NORMAN 23/DPC para restringir o uso de sistemas anti-incrustantes a base de TBT (SANTOS et al., 2010). Em 2010, o Governo Federal através do Ministério do Meio Ambiente criou um projeto de lei denominado 1804-A que foi então aprovado gerando o Decreto Legislativo 797/2010 que aprova a Convenção AFS da IMO de 2001 baseando-se no trabalho desenvolvido por Felizzola et al. (2008) na Baía de Todos os Santos, BA.

O banimento do TBT em tintas anti-incrustantes resultou em um declínio progressivo da ocorrência deste composto em organismos marinhos em todo o mundo (SENDA, 2009). Na baía de Arachon (França), onde os níveis elevados de TBT levaram ao surgimento da regulamentação e proibição das tintas a base deste composto em 1982, ocorreu uma diminuição de 5 a 10 vezes em resultados já de 1985 (AL-RASHDI, 2011). No Reino Unido, Canadá e Austrália também foram observadas declínio dos níveis de imposex e regeneração das populações anteriormente afetadas (DAFFORN et al., 2011). No Brasil, o mesmo efeito de redução de imposex em *S. haemastoma* foi observada por Castro et al. (2011) em estuários da região sul do país.

Entretanto, devido à sua elevada persistência em sedimentos, aliada a legislação pouco eficiente em alguns países, diversos estudos apontam para uma lenta redução do nível de contaminação (GARG et al., 2009; LANGSTON et al., 2009; AIRAKSIEN et al., 2010; FILIPKOWSKA et al., 2011). No Porto de Gdansk, na Polônia foi observada uma redução da concentração de BTs logo após a restrição em 2003, seguida por um aumento em 2008. Neste estudo, os autores indicaram que o aumento observado estaria associado aos resíduos provenientes da remoção do revestimento de navios contendo esses compostos (FILIPKOWSKA et al., 2011). Outros estudos também têm indicado que apesar das restrições a contaminação por OTs ainda permanece presente (FILIPKOWSKA et al., 2011; KIM et al., 2011).

Além disso, apesar das restrições envolvendo tintas à base de TBT, compostos orgânicos de estanho tri, di e monossubstituídos permanecem amplamente permitidos em vários produtos de consumo e tubulações de água podendo ser liberados em sistemas aquáticos (SENDA, 2009; AIRAKSIEN et al., 2010; KOWALSKA et al., 2011). De

acordo com EC (2009), as restrições de OTs trissubstituídos assim como DBT poderão se tornar efetivas até 2015 na Europa.

A partir do momento em que foi constatado que o TBT afetava organismos não alvo, originando elevados níveis de toxicidade, a indústria de “antifoulings” entrou em colapso (YAMAMOTO et al., 2009). Novas tintas anti-incrustantes vêm sendo utilizadas em substituição àquelas a base de compostos organoestânicos (TBT e TPhT). As alternativas mais utilizadas baseiam-se em óxidos metálicos de cobre assim como em biocidas orgânicos (GUARDIOLA et al., 2012). Entre elas podem ser citadas tintas a base de: zinco (piritona), cobre (óxido de cobre, tiocianato cuproso e naftenato de cobre), Irgarol® 1051, 4-cloro-3-metilfenol, Clorotalonil, Piridina TCMS (2,3,5,6-tetracloro-4-(metilsulfonil)piridina), Sea-nine 211, Ziram, ZineB, ManeB, Diclorofluanida, Diuron, Linuron, Tolyfluanid, Thiram e Busan (TCMTB- 2-tiocianometiltiobenzotioazole) (FERNANDEZ e PINHEIRO, 2007; TURNER, 2010; CASTRO et al., 2011; GUARDIOLA et al., 2012). Entretanto, o uso das novas formulações apenas transfere as implicações ambientais geradas pelo TBT a outros níveis e muitas vezes com impacto sobre os mesmos organismos não alvo (DAFFORN et al., 2011).

Assim, devido à sua persistência no ambiente bem como o aporte através de outras fontes, esses contaminantes tem sido encontrados em diversos ecossistemas. Além disso, apesar do risco da contaminação hídrica pela remobilização dos OTs presentes no sedimento, a legislação em muitos países ainda não determina valores para estas substâncias nessa matriz (RADKE et al., 2008). A seguir, serão discutidos os fatores que afetam o comportamento e distribuição dos BTs no ambiente aquático e que determinam a sua biodisponibilidade e assimilação pela biota.

5. Comportamento e Distribuição em sistemas aquáticos

Como previamente discutido, os BTs podem entrar no sistema estuarino através de fontes pontuais: portos comerciais, rotas de navegação, marinas, estaleiros, ancoradouros, boias, redes de pesca; assim como através de fontes não pontuais como efluentes de industriais e urbanos (HOCH, 2001, FENT, 2003) sendo a ocorrência desses compostos associada ao histórico de uso (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

No ambiente aquático, podem estar envolvidos em diversos processos tais como: lixiviação, advecção, difusão, sorção (adsorção e desorção), sedimentação, biodegradação e ressuspensão estando presentes na forma dissolvida e particulada, na água, sedimentos, e tecidos dos organismos presentes no sistema (YAMAMOTO et al., 2009). Os principais processos envolvidos no comportamento do TBT e seus produtos de degradação nos sistemas estuarinos são apresentados na Figura I.1.

Figura I.1. Principais processos envolvidos na distribuição dos BTs no ambiente aquático. Adaptado de Yamamoto et al. (2009).

O TBT é relativamente insolúvel em água (10 mg L^{-1}) sendo que o elevado K_{ow} do TBT (3,54) sugere seu comportamento hidrofóbico (FENT, 1996; WHO, 1999) permanecendo assim por pouco tempo na coluna d'água sendo rapidamente adsorvido aos sedimentos e partículas em suspensão (MPS) (ANTIZAR-LADISLAO, 2008; JADHAV et al. 2011). O comportamento dos BTs no ambiente aquático pode ser influenciado por fatores abióticos tais como temperatura, salinidade, pH, radiação UV, potencial redox, conteúdo de matéria orgânica e granulometria dos sedimentos, que determinam a especiação, complexação e biodisponibilidade desses contaminantes (HOCH, 2001).

Acredita-se que em diferentes valores de pH a sorção do TBT ocorra através do fracionamento hidrofóbico, sendo que a sorção máxima dá-se em pH próximo ao pKa

(6,51) devido à contribuição da troca catiônica (HOCH et al., 2003; XIAO et al., 2011) e onde são observados os maiores valores de K_D devido ao equilíbrio entre a disponibilidade de cátions de TBT e o número de ligantes desprotonados (HOCH et al., 2003; BURTON et al., 2004). Assim, a sorção via complexação do TBT com ligantes superficiais presentes em sedimentos pode ser reduzida em $\text{pH} > 6$ quando o TBT está presente na forma neutra (ex. TBTOH) em decorrência da competição dos sítios disponíveis entre o TBT^+ e os íons majoritários presentes na água do mar (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+). Nessas condições o mecanismo de sorção predominante passa a ser a hidrofobicidade, aumentando a sorção inversamente à polaridade (BURTON et al., 2004).

A salinidade também possui um papel determinante no comportamento geoquímico de contaminantes no sistema estuarino, uma vez que proporciona uma competição entre os cátions de TBT e aqueles presentes na água com maiores salinidades por superfícies de adsorção (BURTON et al., 2004). A salinidade pode também aumentar o fracionamento através do efeito “salting out” (XIAO et al., 2011) reduzindo a sorção através da neutralização do TBT (HOCH, 2004) formado a partir da associação do TBT ao Cl^- presente na água do mar (YAMAMOTO et al., 2008). Em estuários, estudos relacionados aos padrões de adsorção de BTs em sedimentos em diferentes salinidades são importantes devido à influência da maré, responsável pela grande variação desse parâmetro em um curto período de tempo (HOCH et al., 2004) e consequente mudança nos processos de sorção e fracionamento desses compostos.

Juntos, o pH e a salinidade podem dessa forma, atuar na especiação dos BTs assim como a sua sorção em partículas em suspensão e sedimentos uma vez que em pH entre 4 e 6 o TBT apresenta menor afinidade de sorção na salinidade 30 do que em 5psu¹, condizendo com o comportamento de sorção de cátions metálicos em sedimentos estuarinos (BURTON et al., 2004). No entanto, em $\text{pH}=8$, os maiores K_D ocorreram na salinidade de 30psu corroborando com o comportamento de sorção de compostos hidrofóbicos tais como HPAs.

Acredita-se que a destinação, mobilidade e disponibilidade do TBT em ecossistemas marinhos costeiros assim como seus produtos de degradação são também fortemente influenciadas pelo conteúdo de matéria orgânica (PINOCHET et al., 2009) assim como a composição química e mineralógica da matriz (HOCH et al., 2003).

¹ “Practical Salinity Unity”

Compostos hidrofóbicos presentes na água tendem a adsorver ao MPS ou ao sedimento (RÜDEL, 2003) em virtude da proporção de matéria orgânica presente nessas matrizes. Berg et al. (2001) observou que a sorção dos BTs na presença de matéria orgânica apresenta um comportamento reversível (desorção), a partir da formação de complexos entre o átomo de Sn e os ligantes carboxilados e fenólicos, uma vez que na fase aquosa os ligantes orgânicos estão mais facilmente acessíveis do que em compartimentos hidrofóbicos tais como sedimentos. Assim, devido à capacidade de desorção do TBT, sedimentos e MPS podem ser considerados como fontes potenciais de contaminantes para a coluna d'água (ANTIZAR-LADISLAO, 2008), principalmente em sedimentos com elevados teores de matéria orgânica (3-5%) (BURTON et al., 2006).

As associações entre a composição dos sedimentos e os parâmetros físico-químicos dos BTs podem auxiliar na compreensão do fracionamento destes compostos em matrizes abióticas. As superfícies de argilas minerais carregadas negativamente aumentam com o aumento do pH enquanto a quantidade de cátions de BTs diminui e o aumento da competição com íons H^+ em valores de pH também reduzem a capacidade de adsorção (HOCH et al., 2003). Como mencionado anteriormente, em valores de pH superiores a 6 a adsorção de BTs não é controlada pela atração eletrostática e sim por fatores hidrofóbicos e a adsorção segue a ordem $TBT > DBT > MBT$. Nesse processo de variação de pH, as argilas minerais possuem sua superfície carregada negativamente variando entre o estado protonado/desprotonado influenciando diretamente na sorção dos BTs e demais contaminantes orgânicos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Sedimentos de fundo são considerados como reservatórios de diversos contaminantes incluindo BTs, constituindo um risco ecotoxicológico potencial para a biota mesmo após terem entrado no ambiente há muito tempo. Os BTs são adsorvidos em partículas muito finas de sedimento ($<0.063mm$) sendo essas partículas prontamente disponíveis para organismos bentônicos, principalmente detritívoros (STANISZEWSKA et al., 2008). Sedimentos anóxicos, comumente encontrados em regiões estuarinas são capazes de preservar o TBT por períodos de tempo mais longos aumentando dessa forma a persistência desse composto no ambiente aquático (CELEUMANS et al., 1998). Em sedimentos contendo ácidos húmicos, a presença de interações hidrofóbicas entre a cadeia butílica dos BTs e a estrutura aromática dessa matriz favorece ainda mais o processo de aprisionamento desses compostos no sistema (PINOCHET et al., 2009).

A persistência de qualquer contaminante no sistema aquático é resultante de sua degradação aliada aos processos de remobilização física (LANGSTON et al., 2012). Estudos sobre degradação dos BTs indicam que o TBT não é um composto altamente persistente em ambientes aquáticos dinâmicos (SELIGMAN et al., 1996). Mesmo em sedimentos menos redutores, a taxa de degradação do TBT é inferior à encontrada na coluna d'água e o tempo de meia vida irá depender da composição (teor de M.O, granulometria) e disposição (profundidade, condições hidrodinâmicas a que estão expostos) do sedimento, assim como da forma em que o TBT é encontrado (como óxido, hidróxido, haleto, carbonato ou sulfato) (HOCH, 2001). Normalmente, o tempo de meia vida do TBT na água é de poucos dias a poucas semanas (STEWART e DE MORA, 1990) enquanto nos sedimentos a degradação pode atingir de meses a anos (TESSIER et al., 2007). Por esta razão, as concentrações de TBT detectadas em sedimento costumam ser muitas vezes maiores do que àquela encontrada em amostras de água.

A degradação dos BTs nos compartimentos aquáticos pode estar relacionada a fatores bióticos e abióticos (HEROLT et al., 2008) e ocorre através da desalquilação (debutilação) sucessiva até atingir a forma estável inorgânica Sn (IV) (RÜDEL, 2003; GARG et al., 2011). É possível encontrar também a forma Sn II, porém esta, por ser menos estável, pode sofrer oxidação e se transformar em Sn IV (RÜDEL, 2003). A ligação Sn-C pode ser quebrada com a ação de radiação UV, ácidos fortes e agentes eletrofílicos sendo a degradação térmica no ambiente considerada irrelevante (OKORO et al., 2011). Dentre estas formas de degradação, o principal processo ocorre através da clivagem fotoquímica ocasionada pela radiação UV, possível através da quebra da ligação Sn-C pela emissão de 400 kJ.mol^{-1} de energia sendo essa ligação facilmente dissociada a partir de $120\text{-}220 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (NUYTTENS, 2004). Assim, sedimentos de regiões mais rasas ou com elevada atividade de remobilização podem estar mais expostos a essa via de degradação.

Em sedimentos finos misturados à água o tempo de meia vida do TBT é de 2 a 4 dias, sendo que as concentrações dos produtos de degradação (DBT e MBT) na coluna d'água tendem a ser superiores (85 a 90%) em regiões onde o tempo de residência do MPS na água é mais curto. Da mesma forma, em regiões de baixa hidrodinâmica, o TBT pode permanecer estável em sedimentos por muitos anos (HOCH, 2001).

Além da degradação por processos químicos e físicos, a degradação do TBT pode também ser controlada pela atividade microbiana, envolvendo fungos, algas e

bactérias (BUCK-KOEHNTOP et al., 2006). Entretanto, muitas vezes, a concentração do TBT em sedimentos pode ser tão elevada que é capaz de inibir esse tipo de degradação uma vez que atinge o grau de toxicidade para esses organismos (CELEUMANS et al., 1998). Assim, sedimentos são considerados como a maior fonte de bioacumulação de BTs para a biota seguida pelo material orgânico particulado presente na coluna d'água (MICHAUD et al., 2006), sendo esta uma importante ferramenta de remoção/distribuição desse contaminante (CELEUMANS et al., 1998; BERG et al., 2001; MICHAUD et al., 2006; PINOCHET et al., 2009).

Quando sedimentos anóxicos são remobilizados o oxigênio dissolvido penetra nos sedimentos originando a oxidação e refracionamento de contaminantes para a fase dissolvida (FILIPKOWSKA et al., 2011). Dentre os processos de remobilização responsáveis pela passagem dos contaminantes do sedimento para a fase aquosa estão os de origem antrópica (dragagem, movimento de embarcações) e naturais (marés, tempestades, bioturbação e bioirrigação) (FILIPKOWSKA et al., 2011; ROBERTS, 2012).

O fracionamento do TBT entre a água e MPS depende da salinidade, concentração de partículas, constituição orgânica das partículas e pH do meio, sendo que a compreensão desse processo pode auxiliar na interpretação dos resultados encontrados em sedimentos. Harrys and Cleary (1987) observaram um aumento da adsorção do TBT a partículas com o aumento da salinidade, comportamento típico de substâncias hidrofóbicas. Entretanto em outro estudo Unger et al. (1988) demonstraram diminuição dessa adsorção, comportamento similar aos cátions metálicos. Os BTs associados às partículas em suspensão podem ainda permanecer na coluna d'água sofrendo transporte ao longo do sistema estuarino e não chegar a alcançar os sedimentos de fundo (MICHAUD et al., 2006).

No ambiente estuarino, os BTs podem ainda sofrer processos de transformação relacionada aos processos de biometilação que ocorrem no meio aquático (HEROULT et al., 2008). A metilação de compostos orgânicos e inorgânicos de estanho ocorre principalmente em sedimentos anóxicos, onde as bactérias redutoras de sulfato, tais como a *Desulfovibrio sp*, realizam esse processo de transformação através do agente de metilação metilcobalamina (GADD, 2000). De acordo com Ramaswamy et al. (2004) a metilação do TBT é mais eficiente do que a do DBT e a maior implicação relacionada à esse processo é a formação de compostos voláteis que possam ser transferidos do sedimento para a coluna d'água e atmosfera (NUYTTENS, 2004).

Através de todos esses processos, é possível inferir que a persistência, transformação ou degradação dos BTs no ambiente são os principais responsáveis pela biodisponibilidade e impacto sobre as comunidades aquáticas (HEROULT et al., 2008). Além disso, sua difusão, através de processos de ressuspensão pode facilitar a mobilização destes compostos e sua transferência para a biota estuarina, atingindo principalmente invertebrados e peixes que estão em contato direto com as regiões mais profundas (BERTO et al., 2007).

6. Biodisponibilidade e assimilação

Para estimar a biodisponibilidade do TBT em sistemas estuarinos é necessário verificar suas principais fontes assim como o comportamento desse composto no sistema (HOCH et al., 2004; LACORTE et al., 2006). Como discutido na seção anterior (5), devido a mudanças nas condições físico-químicas da água e sedimento formas específicas de OTs podem ser liberados a partir do sedimento se tornando também biodisponíveis para organismos pelágicos, sendo, ainda, passíveis de transporte para regiões mais afastadas da fonte (GARG et al., 2011). Assim, os sedimentos em suspensão representam a ligação entre a contaminação presente nos sedimentos de fundo e a fração de contaminantes disponível na coluna d'água e consequente assimilação pela biota (DAFFORN et al., 2012).

Sabe-se que os danos de um contaminante no organismo são influenciados pela biodisponibilidade do mesmo, a forma de exposição, a via de entrada, o nível de contaminação e tempo de exposição (FENT, 2006). Organismos marinhos estão expostos a partir do sedimento, coluna d'água e através da dieta (MORCILO et al., 1997; CAMPILLO et al., 2004) sendo que o acúmulo/assimilação pode acontecer através de uma variedade de mecanismos ativos e passivos (DAFFORN et al., 2011), levando à assimilação destes poluentes em níveis elevados e de maneira rápida (MORCILLO et al., 1997). Muitas vezes, os BTs presentes no ambiente aquático são assimilados por organismos presentes na coluna d'água e parcialmente metabolizados antes de atingir o fundo, diminuindo a concentração de BTs na superfície dos sedimentos (MICHAUD et al., 2006).

Muitas propriedades são responsáveis pela biodisponibilidade de um composto hidrofóbico, incluindo as propriedades físico-químicas, rotas de exposição do organismo e transporte físico através da membrana celular. Além disso, as

características físico químicas dos contaminantes tais como peso molecular, forma e grau de hidrofobicidade são importantes para o fracionamento desses compostos nos compartimentos ambientais (ELSKUS et al., 2005). A presença de grupos alquil em BTs possibilita um aumento em suas propriedades lipofílicas, permitindo o processo de bioacumulação destes contaminantes pela biota (ALZIEU, 1996) uma vez que possuem uma forte associação a substâncias apolares como lipídios (MEADOR et al., 2002). O equilíbrio de partição ocorre quando o sedimento e a água estão em equilíbrio e o organismo recebe uma exposição referente a cada uma dessas fases, permitindo prever qual a dose que será aportada por cada uma das fases. Assim, a fugacidade ou atividade química para compostos hidrofóbicos está associada principalmente ao teor de lipídios, carbono orgânico total em sedimentos assim como a fase aquosa sendo que o equilíbrio da concentração em cada fase está relacionada a propriedades termodinâmicas e não à cinética de acumulação (MEADOR et al., 2002). Tecidos com elevados teores lipídicos apresentam compostos apolares mais fortemente correlacionados a lipídios neutros do que ao teor total de lipídios (ELSKUS et al., 2005).

A bioacumulação de compostos químicos é geralmente estimada pelo seu K_{ow} , sendo considerado bioacumulativo se o $\log K_{ow}$ for superior a 3 (VAN der OOST et al., 2003; HU et al., 2006). O K_{ow} do TBT é maior em pH 8 do que em pH 3, o que reduz a biodisponibilidade pela maior adsorção desse composto (LACORTE et al., 2006). O fator de bioacumulação (BAF) de compostos orgânicos hidrofóbicos é geralmente expresso como a razão entre o tecido e o sedimento podendo ser normalizado utilizando-se a correção dos tecidos pelo teor lipídico e os sedimentos pelo teor de carbono orgânico sendo expressos como (BSAF) (MEADOR et al., 2002). Para o TBT, a melhor forma de expressar a capacidade de bioacumulação é através da normalização do BAF pelo carbono orgânico uma vez que o conteúdo lipídico não controla a bioacumulação desse composto (MEADOR et al., 2002). O valor de BSAF para TBT pode variar entre 0,02 para espécies tolerantes e 0,5 para as sensíveis ocorrendo uma elevada taxa de assimilação ou um metabolismo lento desse composto.

Devido ao grande impacto sobre a biota através da biodisponibilidade dos BTs, informações a respeito da assimilação assim como os efeitos ecotoxicológicos ao longo da cadeia trófica são necessários (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). A utilização de organismos para o monitoramento ambiental permite verificar a integração da fração biodisponível do contaminante uma vez que existe uma relação direta entre a presença

de contaminantes no sedimento e os efeitos observados principalmente em comunidades bentônicas (BARTOLOMÉ et al., 2010).

Em peixes, a principal rota de entrada desses compostos ocorre via compartimentos abióticos (sedimentos e água) contendo níveis significativos desse contaminante (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). No entanto, efeitos indiretos podem ser observados ao longo da cadeia trófica, uma vez que muitos contaminantes são passíveis de bioacumulação e até mesmo biomagnificação. Estes efeitos podem culminar com a eliminação de espécies que servem de base da cadeia alimentar, agravando o dano ao ecossistema por interações populacionais (FENT et al., 1994).

Na Figura I.2 estão presentes as principais fontes de incorporação de contaminantes em peixes assim como os processos envolvidos na bioacumulação desses compostos (BTs). A assimilação de contaminantes a partir de matrizes abióticas ou alimentação ocorre de forma difusa e muitas vezes esses contaminantes passam diretamente através das brânquias sem que ocorra a adsorção (NEWMAN, 2001). Entretanto, podem estar adsorvidos na superfície corpórea ou trato respiratório (incluindo brânquias) (FENT et al., 1994). Uma vez no organismo, os contaminantes podem ser distribuídos para os órgãos internos, atingindo principalmente o fígado e rins, porém sendo encontrados em concentrações mais elevadas no sangue, gônadas e músculo. No fígado, podem sofrer processo de biotransformação em forma mais ou menos tóxicas que podem ser eliminadas através da excreção pela urina e fezes (NEWMAN, 2001).

Figura I.2. Conceito simplificado da acumulação de contaminantes em peixes. Adaptado de Newman (2001).

Assim, o risco para a biota na presença de um determinado contaminante no ambiente pode ser função de sua toxicidade e concentração ambiental, sendo igualmente importante definir o risco a partir de sua biodisponibilidade (FENT et al., 1994), bioconcentração, potencial de acumulação, rotas de exposição além de sua persistência. Estudos envolvendo a análise de BTs em peixes provenientes de regiões portuárias são importantes uma vez que contribuem para a compreensão das relações causa-efeito em condições naturais, gerando o conhecimento a respeito do impacto causado aos recursos pesqueiros (KANNAN et al., 1995).

7. Toxicidade

Organismos aquáticos expostos a BTs apresentam uma diversidade de efeitos tóxicos relacionados a esses compostos (OKORO et al., 2011). A toxicidade dos BTs é geralmente atribuída ao número de substitutos alquil, com máxima atividade biológica observada para os compostos trissubstituídos ($n=3$) (ANTIZAR-LADISLAO, 2008) além da natureza dos radicais associados à molécula (BUCK-KOEHNTOP et al., 2006). O estanho (Sn) é considerado como não tóxico em sua forma metálica devido à baixa absorção pelos organismos (RÜDEL, 2003). Entretanto, o TBT é considerado um composto altamente tóxico, sendo seus efeitos reportados em organismos de diversos níveis tróficos, de bactérias a mamíferos, afetando seu crescimento, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência (ANTIZAR-LADISLAO, 2008) em concentrações de poucos ng L^{-1} (ALZIEU, 1996).

Em termos de exposição e concentrações subletais os moluscos são conhecidos como o *táxon* mais sensível ao TBT, fato relacionado principalmente a sua baixa capacidade de metabolização e elevada taxa de assimilação (MEADOR et al., 2002). A inibição de crescimento e o desenvolvimento da síndrome de alteração endócrina denominada imposex (imposição sexual) em moluscos são reportados como os principais efeitos associados à contaminação e exposição por TBT (MEADOR et al., 2002) caracterizado pelo surgimento de caracteres masculinos em fêmeas de gastrópodes (FERNANDEZ et al., 2002).

Além de moluscos, o TBT é conhecido por desencadear efeitos agudos e crônicos em outros organismos aquáticos sensíveis como algas, zooplâncton, e larvas de algumas espécies de peixes (FILIPKOWSKA et al., 2011) afetando seu crescimento e reprodução (GARG et al., 2011; HORIGUCHI et al., 2012). Em peixes também é

responsável por efeitos letais afetando diretamente o sistema imune (KANNAN et al., 1995) e interferindo em processos biológicos de diversas espécies causando desordens no sistema hormonal (LISCIO et al., 2009).

A toxicidade dos BTs irá depender da concentração e duração da exposição, biodisponibilidade, e da sensibilidade do organismo sendo os efeitos de alteração endócrina os mais impactantes (RÜDEL, 2003). A capacidade de metabolização e excreção variáveis de acordo com a espécie também são fatores muito importantes para a avaliação do risco ecotoxicológico dos BTs na biota aquática. A toxicidade dos BTs para a biota estuarina e principalmente aos peixes associados a esse sistema serão apresentados e discutidos nos Capítulos III e IV deste estudo.

Como observado neste Capítulo, a persistência e toxicidade dos BTs tornam necessária a avaliação dos níveis de poluição em amostras biológicas, particularmente em organismos que vivem em contato direto com o sedimento uma vez que esta matriz atua como reservatório e fonte desses compostos para o sistema estuarino. Assim, apesar da característica principal de acúmulo nesta matriz, dependendo da dinâmica estuarina em questão, os OTs presentes nos sedimentos podem ser liberados para a coluna d'água, criando-se um risco ecotoxicológico mesmo anos após a supressão de seu aporte além da exposição constante de espécies bentônicas.

Devido à ausência de regulamentação dos níveis de TBT em sedimentos existe uma necessidade constante de caracterização dos efeitos que eles podem causar no sistema estuarino. No Brasil, evidencia-se a necessidade do monitoramento destes compostos principalmente em matrizes biológicas, onde ainda existe uma lacuna a respeito da ocorrência dos BTs, e seu impacto na cadeia alimentar. Em decorrência de sua elevada toxicidade, a análise de BTs em compartimentos ambientais torna-se indispensável assim como o desenvolvimento de metodologias capazes de quantificar esses contaminantes de forma precisa e segura para que a avaliação de risco não seja superestimada.

Capítulo II – Análise de Compostos Butílicos de Estanho em matrizes ambientais

1. Introdução

A especiação e quantificação de contaminantes são considerados processos de grande importância uma vez que a toxicidade, biodisponibilidade e mobilidade de um composto no ambiente são dependentes da forma particular em que eles ocorrem. Desde a descoberta do impacto causado pela presença de compostos butílicos de estanho (BTs) no ambiente, um grande número de estudos têm sido desenvolvidos, tendo como foco a análise desses compostos em sedimentos e biota uma vez que essas matrizes permitem verificar o tempo de residência e distribuição desses contaminantes assim como o real risco para o ecossistema estudado (STANISZEWSKA et al., 2008).

Além disso, apesar da maioria dos estudos terem como foco a análise de BTs em matrizes abióticas tais como água e sedimento, sabe-se que nem sempre a concentração detectada nessas matrizes corresponde ao risco associado à biota e o potencial ecotoxicológico desses contaminantes deve ser avaliado com cautela levando-se em consideração a quantificação diretamente no tecido do organismo cujo risco pretende ser avaliado.

A grande complexidade das matrizes ambientais e as baixas concentrações em que a maioria dos contaminantes são encontrados fazem com que os processos analíticos sejam cada vez mais seletivos e robustos, necessitando de um minucioso controle de qualidade dos processos envolvidos, uma vez que as matrizes podem apresentar interferência de substâncias que são coextraídas e que afetam diretamente a identificação dos analitos de interesse assim como a correta determinação das concentrações ambientais. Para evitar a interferência desses compostos, são adicionadas etapas no processo analítico que permitam a remoção desses elementos indesejados assim como utilização de equipamentos mais seletivos ou alterações de condições que permitam a melhor separação dos picos cromatográficos.

Embora existam estudos enfocando a determinação de BTs em brânquias e fígado de peixes nenhum trabalho foi encontrado com bagres, o que justifica a otimização e validação de um método para as análises pretendidas. No Capítulo II deste trabalho, são apresentados procedimentos de otimização e validação de métodos analíticos utilizados para a determinação de BTs em sedimentos, MPS e em tecidos (fígado e brânquias) de três espécies de bagres estuarinos comumente encontrados na costa brasileira: *Cathorops spixii*, *Genidens genidens* e *Aspistor luniscutis*, assim como um estudo detalhado do efeito matriz sobre a resposta analítica.

2. Revisão de Literatura

Compostos butílicos de estanho (BTs) vêm sendo investigados em uma variedade de matrizes ambientais devido à sua grande importância ecotoxicológica e consequente impacto nos ecossistemas aquáticos (HOCH, 2001; SANTOS et al., 2010).

Os BTs podem estar presentes no ambiente associados à carbonatos, cloretos, sulfatos, sulfetos, hidróxidos e biopolímeros ou ainda como óxidos interagindo com as matrizes ambientais por associações hidrofílicas ou hidrofóbicas (ABALOS et al., 1997; GODOI, 2001). Em sedimentos as dificuldades encontradas baseiam-se na complexidade química da matriz, nas baixas concentrações encontradas (ng g^{-1}) e na forte sorção dos BTs nessa matriz (AL-RASHID, 2011) afetando as recuperações dos analitos de interesse (STANISZEWSKA et al., 2008).

O primeiro passo importante a ser considerado tanto para a análise de BTs quanto de qualquer outro contaminante é o planejamento amostral. Nesse planejamento, existe a necessidade de coleta de subamostras que assegurem a representatividade da análise pretendida (STANISZEWSKA et al., 2008). Amostras de sedimento ou biota provenientes de um mesmo local certamente irão conter níveis de contaminantes que podem diferir em uma ou mais ordens de grandeza ao longo das subamostras devido aos diferentes microambientes em que estão inseridas (CHAMP e SELIGMAN, 1996). Nas amostras abióticas, diferenças físicas e químicas (granulometria, carbono orgânico e ação de correntes) enquanto que nas bióticas, as diferenças fisiológicas (sexo, maturidade e estágio de desenvolvimento) possuem papéis importantes na discussão dos resultados (CHAMP e SELIGMAN, 1996). Dessa forma, a obtenção de amostras mais representativas (uso de réplicas amostrais) pode atenuar a grande variabilidade temporal e espacial dos BTs geralmente detectados em baixíssimas concentrações (ng g^{-1} ou ng L^{-1}) em matrizes ambientais (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010).

Além da amostragem, o correto tratamento, cuidados na manipulação e armazenamento das amostras devem ser considerados para reduzir possíveis perdas dos compostos de interesse ou mesmo a contaminação por agentes externos já nas etapas que antecedem os procedimentos analíticos (STANISZEWSKA et al., 2008; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010).

Em matrizes abióticas tais como água, sedimento a diversidade de técnicas analíticas associadas à quantificação de BTs são amplas (GODOI, 2001; SANTOS, 2008; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). No entanto, em organismos, a análise dos BTs

é menos abordada uma vez que um dos principais efeitos desse contaminante sobre o sistema pode ser observado primeiramente na morfologia e comportamento dos indivíduos (FENT et al., 1998; MOCHIDA et al., 2007).

Como já mencionado, no Brasil, ainda não existem estudos envolvendo essa matriz (peixes) e o desenvolvimento de um método que atenda as nossas condições torna-se importante para que também possamos obter o real impacto causado por esses compostos em nossos estuários e sistemas costeiros.

Nas próximas seções (2.1. a 2.4.) estão detalhadas as etapas envolvidas no processo de análise de BTs em matrizes ambientais assim como os principais sistemas analíticos utilizados.

2.1. Extração

Uma das maiores dificuldades na análise de BTs consiste em sua etapa de extração, sendo a maior preocupação relacionada à dissolução de amostras sem o comprometimento da integridade química dos analitos (GODOI et al., 2003a). Essa dificuldade ocorre, muitas vezes, porque os compostos organometálicos podem estar fortemente ligados aos tecidos biológicos sendo necessário o uso de condições extremas de extração para torná-los disponíveis (CHAU et al., 1996).

Compostos orgânicos de estanho são geralmente extraídos por lixiviação ácida a partir de tecidos e/ou sedimentos previamente homogeneizados (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). Cassi et al. (2002) apontam que alguns problemas podem ser encontrados já nessa etapa uma vez que no processamento de amostras biológicas emulsões e interfaces coloidais podem aparecer entre a fase orgânica e aquosa interferindo na recuperação da fase orgânica e levando a subestimação e/ou baixa reprodutibilidade.

A extração de BTs em diversas matrizes é comumente desenvolvida através do uso de solventes de baixa a média polaridade tais como hexano, tolueno, benzeno e diclorometano (GODOI et al., 2003b; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010) combinados com um ácido tais como o acético ou clorídrico (GALLEGO-GALLEGOS et al., 2006), sendo esse último mais eficiente na extração do monobutilestanho (MBT) (CELEUMANS e ADAMS 1995; CHAU et al., 2006). Em matrizes biológicas além da etapa de extração é comumente utilizada uma etapa pré-extração para que ocorra a completa dissolução do tecido. Além disso, a adoção do efeito “salting out” através da

utilização de NaCl pode aumentar a eficiência da extração uma vez que possibilita a passagem dos analitos mais facilmente para a fase orgânica do extrato (ABALOS et al., 1997). A adição de ácidos fortes aos extratos de sedimento pode aumentar o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) para o TBT auxiliando na extração (STANISZEWSKA et al., 2008).

Para aumentar a eficiência de extração principalmente de compostos mono e dissustituídos, são adicionados agentes complexantes (CELEUMANS e ADAMS, 1995) sendo que a tropolona e o pirrolidinadietilcarbamato de amônio (APDC) estão entre os mais utilizados (IKONOMOU et al., 2002; GODOI et al., 2003b) ambos com bons resultados registrados. De acordo com Abalos et al. (1998), o uso desses agentes tais como o APDC favorece a formação de complexos neutros aumentando a partição dos OTs para a fase orgânica.

Além da extração líquido:líquido (LLE), o uso da extração em fase sólida (SPE) tem sido proposta como alternativa para análise de OTs em matrizes aquosas ou mesmo na extração de amostras de sedimento (DEVOS et al., 2005), isso, devido à simplicidade de uso, elevado poder de pré-concentração e capacidade de analisar espécies voláteis metiladas e compostos fenílicos (LE GAC et al., 2003). A aplicação desse procedimento de extração pode ainda auxiliar na redução de compostos sulfurosos presentes no extrato (BRAVO et al., 2010). A microextração em fase sólida (SPME) também vem sendo empregada com sucesso em análises de OTs para aumentar a eliminação de interferentes bem como reduzir os limites de detecção do sistema analítico (LE GAC et al., 2003). Além dessas técnicas, a extração com fluido supercrítico (SFE) também foi empregada em alguns trabalhos para a extração de OTs de amostras biológicas (FÉRNANDEZ-ESCOBAR e BAYONA, 1997).

2.2. Derivação

Após os procedimentos de extração, devido ao caráter não volátil de grande parte dos OTs (principalmente os de grande interesse), e para que sejam possíveis as análises por cromatografia a gás, as espécies extraídas da matriz amostral necessitam ser convertidas em sua forma volátil, passível de separação através do sistema analítico (CASSI et al., 2002; XIAO et al., 2008). Assim, a extração das amostras após a digestão ácida deve ser seguida pela etapa denominada derivação (HOCH, 2001).

Os processos de derivação mais comuns para OTs são obtidos através da hidrogenação com borohidreto de sódio (NaBH_4), etilação com tetraetilborato de sódio (NaBEt_4), e pentilação com reagente de Grignard (Brometo de Pentilmagnésio) (MORABITO et al., 2000). Apesar de demandar um maior tempo de análise, alguns estudos apontam para melhores resultados a partir da pentilação com reagente de Grignard em decorrência da maior eficiência de extração (CHAU et al., 1997) e maior reprodutibilidade (XIAO et al., 2008). O Reagente de Grignard é um composto organometálico que possui um comportamento de base forte e é atraído por centros deficientes de elétrons. Quando adicionado a extratos orgânicos contendo BTs ocorre a reação pela adição de grupos alquil originando derivativos tetraalquilestânicos, compostos estáveis que podem ser facilmente separados por cromatografia a gás (CHAMP e SELIGMAN, 1996; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). Devido à sua reatividade em contato com a água e ar deve ser cuidadosamente manipulado sendo que para amostras aquosas o NaBEt_4 é mais indicado (EVANS et al., 2009). Apesar de também apresentar sensibilidade ao ar, necessitando de cuidados especiais, a derivação com NaBEt_4 converte as moléculas butílicas e fenílicas em seus derivados voláteis com eficiência e rapidez (CASSI et al., 2002) sendo o agente de derivação mais utilizado nos estudos com OTs (STANISZEWSKA et al., 2008).

Em decorrência da necessidade de derivação dos OTs para a análise por CG, faz-se indispensável a adoção de métodos que possuam uma maior precisão e exatidão, onde as perdas durante o processo de derivação possam ser reduzidas.

2.3. Purificação dos extratos “Clean-up”

A determinação de BTs em matrizes complexas pode apresentar grandes dificuldades, incluindo baixa recuperação e eficiência de derivação (CASSI et al., 2002). Extratos de amostras ricas em matéria orgânica geralmente carregam substâncias que são co-extraídas (lipídios e hidrocarbonetos) e que podem se depositar na coluna cromatográfica, influenciando a separação e aumentando o “background” do detector (DIRX et al., 1994). Além disso, estes interferentes podem provocar a sobreposição de picos com o analito devido a impurezas, aparecimento de picos fantasmas e redução do tempo de vida da coluna cromatográfica (GODOI et al., 2003b), a distorção da linha de base é mais um dos problemas relacionados ao efeito matriz (CASSI et al., 2002).

Para tentar reduzir esses interferentes, após a etapa de derivação, recomenda-se a realização do “clean-up” das amostras, feito geralmente em uma coluna com material adsorvente adequado (GODOI et al., 2003a). A purificação dos extratos ocorre através de processos de adsorção proporcionada pelos sítios de ligação presentes no material adsorvente aos quais podem se ligar os constituintes do extrato, de uma forma reversível (ligação de van der Waals) ou irreversível. O primeiro tipo de ligação é o desejável para os analitos de interesse, enquanto que o segundo, idealmente, deve ocorrer para os interferentes (GODOI, 2001; OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). Esta etapa de limpeza do extrato é considerada essencial para o aumento da eficiência no tratamento da amostra, especialmente para compostos alquilados de estanho di- e monossustituídos, sendo capaz de reduzir inclusive até 90% do conteúdo de lipídios da amostra (QUEVAUVILLER, 1996). Os adsorventes mais utilizados são a sílica gel (com sítios ativos silanóis²- Si-OH), a alumina (com sítios ativos Al-OH) e o Florisil (H₂MgO₄Si), preferido para matrizes bióticas com alto conteúdo lipídico (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010). Normalmente devem ser ativadas por aquecimento antes do uso para retirada de água ou outras moléculas que tenham sido adsorvidas do ar (GODOI et al., 2003b).

Sedimentos estuarinos, por serem comumente anóxicos (BRAVO et al., 2004) são ricos em compostos de enxofre proveniente da atividade microbiana que converte sulfato e sulfeto em enxofre elementar. Dessa forma, esse problema necessita de uma especial atenção para que não ocorram erros de quantificação dos BTs e os picos interferentes não possam ser tomados como os analitos de interesse ou mesmo mascarar-los gerando discrepâncias nos resultados (MECHLINSKA et al., 2012). Além dos compostos sulfurosos, outros artefatos detectados na análise de BTs em sedimentos podem ser decorrentes da presença de compostos metilados tais como o metil-mono, di ou trimetilestano, resultantes de processos de biometilação. Na maioria dos estudos, entretanto, esse picos são determinados como não identificados e dessa forma sem qualquer discussão (VELLA et al., 2000).

A interferência de compostos sulfurosos pode ser minimizada ou eliminada pela adição de mais uma etapa do procedimento analítico. Dentre as mais utilizadas estão: a utilização do cobre (Cu) ativado em pó, sulfeto de tetrabutylamônio, mercúrio e dimetildioxirano (DMD) seguido por coluna de alumina (SCHUBERT et al., 1998).

² Silanóis: Compostos de silício hidroxilados com características adsorptivas funcionando tanto como doador quanto aceptor de prótons (PIZZUTTI et al., 1996).

Outros trabalhos apontam para a utilização de SPE (BRAVO et al., 2010) ou mesmo SPME em modo “headspace” (HS) com a função de eliminar a coeluição entre analitos e interferentes (BRAVO et al., 2004; MZOUGHJI et al., 2005). O uso de MISPE (“solid phase extraction employing imprinted materials”) também é mencionado na literatura para redução desses interferentes na análise de OTs (GALLEGO-GALLEGOS et al., 2006). Após a purificação dos extratos, os analitos encontram-se prontos para a detecção no sistema analítico.

2.4. Sistemas Analíticos

A análise de OTs está relacionada a técnicas baseadas na combinação de separação por cromatografia aliada a um método seletivo de detecção. A cromatografia a gás (CG) é a mais utilizada nos estudos envolvendo análise de BTs, devido à maior sensibilidade e seletividade. Entretanto, também são encontrados trabalhos envolvendo cromatografia líquida (HPLC) (QUEVAUVILLER, 1996; YANG et al., 2003; GALLEGOS-GALLEGOS et al., 2010). A sensibilidade na determinação de OTs é possível através do uso de detectores seletivos (CHAMP e SELIGMAN, 1996) tais como detector fotométrico de chama (“flame photometric detector” - FPD), detector fotométrico de chama pulsante (“pulsed flame photometric detector” -PFPD), e espectrometria de massas (“mass spectroscopy” -MS) que pode estar acoplada à plasma (ICP) ou detector de emissão atômica (AED) (LE GAC et al., 2003; TANG & WANG, 2007; GUÉRIN et al., 2007; XIAO et al., 2008). Recentemente, para análise em peixes o detector de captura de elétrons (CG-ECD) também vem sendo utilizado (AMINI et al., 2012).

2.4.1. GC- PFPD

O Detector Fotométrico de Chama Pulsante (PFPD) foi desenvolvido pelo prof. Aviv Amirav nos anos 1990 como uma adaptação ao sistema pré-existente Detector Fotométrico de Chama (FPD) e inicialmente utilizado para análise de enxofre, fósforo e nitrogênio (AMIRAV e JING, 1995). Com a modificação, ocorre um fluxo contínuo de gás com uma chama inconstante onde a combustão ocorre apenas quando a câmara é preenchida pela mistura de gases necessários para a obtenção da chama, composta por ar sintético e hidrogênio (BACON-MONTIGNY et al., 2000). Em comparação com o

FPD também existe uma redução do volume de gás utilizado e maior detectabilidade e sensibilidade (GODOI et al., 2003a). A chama obtida nessa mistura gera uma emissão quimioluminescente que dependerá do tempo de exposição assim como das características dos analitos envolvidos (BRAVO et al., 2004). Por conseguinte, essas variáveis permitem a separação eletrônica de uma emissão específica originando informações a respeito da composição de um pico cromatográfico. O período de tempo de emissão que será integrado para gerar o sinal de detecção pode ser selecionado ajustando-se o início (“gate delay”) e a duração (“gate width”) da detecção de acordo com o perfil do analito estudado (BACON-MONTIGNY et al., 2000).

Nesse sistema analítico, os gases são divididos em: Ar 1 misturado com o hidrogênio (H_2) utilizados como gás de arraste conduzindo os analitos do injetor ao detector; e ar 2, adicionado à mistura do detector para ajustar a razão Ar- H_2 e controlar a taxa de ignição. O pulso da chama ocorre de 2 a 4 vezes por segundo (BACON-MONTIGNY et al., 2000).

A chama decompõe (queima) a amostra contendo os OTs e gera a emissão óptica em um comprimento de onda típico resultante da ligação Sn-C ou Sn-H. As ligações Sn-C ocorrem na faixa de emissão do azul 390nm enquanto que as ligações Sn-H são emitidas no comprimento de onda de 610nm, vermelho. Apesar de mais sensível aos OTs (emissão cerca de 100 a 1000x maior), o filtro de 390 nm também recebe emissões de outros interferentes que podem estar presentes na amostra e dificultar a quantificação desses analitos. Essa interferência envolve principalmente compostos de enxofre (S) (BACON-MONTIGNY et al., 2000; BRAVO et al., 2004).

Após a propagação da chama a luz é emitida pela excitação das espécies moleculares no combustor e passa através no filtro monocromático produzindo um sinal na célula fotomultiplicadora (PMT) (AMIRAV e JING, 1995). A Figura II.1 mostra o desenho esquemático do PFPD com seus principais componentes.

Figura II.1. Desenho esquemático do detector fotométrico de chama pulsante (PFPD). Adaptado de Amirav e Jing (1995).

2.5. Procedimentos de Validação

Na análise de BTs em matrizes ambientais, a diversidade de técnicas contendo uma série de etapas e cada vez mais sensíveis, não aparecem necessariamente acompanhadas pela preocupação com o controle de qualidade e confiabilidade dos dados apresentados (QUEVAUVILLER, 1996). No entanto, o processo de análise desses compostos, independente da matriz escolhida, é no geral, um procedimento minucioso, que necessita de um grande cuidado para evitar que ocorram perdas significativas, necessitando passar por uma etapa de validação analítica.

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), validação é o processo no qual se obtém a garantia de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, gerando uma maior confiabilidade dos resultados. Alguns parâmetros de confiabilidade presentes na literatura tem como base, em sua maioria, critérios estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (RIBANI et al., 2004).

Dentre esses parâmetros analíticos para a validação de métodos de separação (como a cromatografia a gás) estão: a seletividade, especificidade, linearidade e faixa de aplicação, sendo que a quantificação dos analitos pode ser obtida seguindo ainda métodos de padronização interna, precisão, repetibilidade e exatidão (INMETRO, 2010; BRASIL, 2003).

A precisão e exatidão do método são avaliadas a partir do uso de materiais de referência certificados (CRMs) ou através da adição do padrão (“spiking”) na matriz de interesse desde que esta não contenha o analito ou que ele esteja em baixas concentrações (IUPAC, 2002). Nos CRMs, a matriz a ser analisada já possui uma quantidade conhecida do analito em questão, porém a maior dificuldade em trabalhar com esse material é a disponibilidade de produtos específicos, principalmente para matrizes biológicas (STANISZEWSKA et al., 2008). Para sedimentos marinhos, os CRMs mais utilizados são o PACS-1 e PACS-2 da National Research Council of Canada (NRCC) e o BCR462-R do Institut for Reference Materials of the European Commission, por se tratarem de sedimentos de portos e costeiros (STANISZEWSKA et al., 2008). Para análise de BTs em tecidos de peixes, o mais utilizado na literatura é o NIES-11 da National Institute for Environmental Studies (Environmental Agency of Japan), porém o responsável pela fabricação do mesmo suspendeu a comercialização em 2008³. Dessa forma, CRM alternativos tais como tecidos de moluscos vêm sendo utilizados. Uma alternativa recente para verificar a precisão e exatidão do método inclui ainda o uso de isótopos estáveis através da técnica denominada Análise de Diluição Isotópica (IDA) que vem demonstrando grande eficiência na visualização de erros sistemáticos presentes no procedimento de análise por ICP-MS (ENCINAR et al., 2002).

A recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente (MONTIGNY et al., 1998). Dessa forma, o uso de “surrogates”, ou seja, compostos substitutos que possuem grande semelhança com a substância de estudo (CHAMP e SELIGMAN, 1996), podem também ser utilizados para a realização de ensaios de recuperação durante a análise (IUPAC, 2002; INMETRO, 2003; BRASIL, 2003). No entanto, uma atenção especial deve ser dada na utilização do surrogate uma vez que, além da importância de ser semelhante aos analitos de interesse este deve ser adicionado à matriz por um período mínimo 12hs (“overnight”) para que ocorra a interação analito-matriz e a recuperação final possa representar a eficiência do processo analítico para todos os analitos (STANISZEWSKA et al., 2008).

O método do padrão interno é utilizado para corrigir os erros de injeção no equipamento (RIBANI et al., 2004). Para os BTs são comumente utilizados o

³ Comunicação pessoal - Miyuki Ukachi, National Institute for Environmental Studies, Japan, através de e-mail enviado em 2008.

tetrabutilestanho (TeBT) por ser semelhante aos compostos butílicos e devido à sua volatilidade sem que haja necessidade de derivação (GODOI et al., 2003b).

Para a validação de um método analítico, também são determinados os limites de detecção (menor concentração da substância que pode ser detectada) e de quantificação (menor concentração da substância que pode ser medida), obtidos para o método e para o equipamento utilizado (RIBANI et al., 2004). A escolha do método analítico pode ser adaptada às condições existentes no laboratório desde que a confiabilidade dos dados possa ser mantida (THOMPSON et al., 2002).

2.6. Avaliação do Efeito Matriz

Um parâmetro importante de validação compreende a sub ou superestimação da concentração dos analitos em consequência do efeito matriz das amostras estudadas, principalmente em amostras complexas tais como sedimentos e biota (MONTIGNY et al., 2008). Este parâmetro de desempenho analítico deve ser cuidadosamente avaliado, pois permite verificar se os componentes da matriz afetam a resposta analítica de alguma maneira (PINHO, 2009) e, de acordo com Thompson et al., 2002, pode muitas vezes ser o principal fonte de erro conhecida em medições analíticas.

Neste processo, alguns efeitos tais como picos falsos positivos e negativos e diminuição do sinal emitido em amostras podem ser observados na análise cromatográfica quando comparados os resultados dos analitos preparados entre solvente e matriz (HAJŠLOVÁ et al., 1998; PINHO et al., 2009). O efeito de componentes residuais da matriz coeluídos no mesmo tempo de retenção dos analitos desejados podem também ser observados, dificultando a identificação do composto de interesse (STORM, 2008).

Os efeitos observados podem, por exemplo, ser oriundos da interação com o injetor e a possível degradação ou adsorção do analito no “liner” (CARDOSO et al., 2008; SAARI et al., 2007; PINHO, 2009); ou, ainda da interação dos componentes da matriz com a coluna ou o detector, podendo conseqüentemente aumentar ou diminuir a resposta do sistema de detecção (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003). De acordo com Pinho (2009), este procedimento permite explicar as elevadas taxas de recuperação de um analito (superiores a 100%) assim como a baixa precisão dos resultados.

Para BTs, este efeito pode levar a uma diminuição da intensidade dos picos dos no extrato da matriz quando comparados aos dados obtidos para os padrões no solvente

(TANG & WANG, 2007). Isso porque quando preparamos os padrões em solvente os sítios ativos (grupos silanóis livres e metais) presentes na superfície do liner não estão ativados e disponíveis para a retenção dos analitos (SAARI et al., 2007; PINHO, 2009). Na análise de pesticidas o efeito observado costuma ser o oposto (SAARI et al., 2007), pois ocorre o aumento da resposta cromatográfica dos analitos na presença dos componentes da matriz.

O efeito também pode ser ocasionado pela degradação térmica dos analitos no injetor, quando a superfície está aquecida em excesso ocasionando uma diminuição da adsorção dos analitos que são transferidos para a coluna cromatográfica (HAJŠLOVÁ et al., 1998; SAARI et al., 2007; PINHO, 2009). O uso do padrão interno auxilia na observação deste efeito, uma vez que possibilita a visualização da eficiência de injeção, corrigindo possíveis alterações.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Otimização e validação de método para a análise de BTs em tecidos de peixes (brânquias e fígado) a partir de metodologias existentes.

3.2. Objetivos específicos

- Aplicação de ferramentas de controle de qualidade analítico para assegurar a confiabilidade dos resultados;
- Avaliação de efeito matriz em sedimentos e tecidos do bagre estuarino *Cathorops spixii* para análise de BTs por GC-PFPD.

4. Materiais e Métodos

A parte analítica do trabalho foi desenvolvida no Laboratório GRESCO (Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos), do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Unesp, Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi. As atividades desenvolvidas nesse laboratório envolveram a otimização do método para todas as matrizes estudadas assim como as análises ambientais de todos os estuários propostos e dos estudos de toxicidade.

4.1. Padrões analíticos, solventes e reagentes

Os compostos butílicos de estanho TBT (96% tributyltin chloride), DBT (96% dibutyltin dichloride), MBT (95% butyltin trichloride), TPrT (98% tripropyltin chloride) e TeBT (96% tetrabutyltin) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), assim como a alumina neutra e o reagente de Grignard (2M pentylmagnesium bromide in diethyl ether). O metanol, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, hidróxido de sódio e sulfato de sódio foram obtidos pela JT Baker (Xalostoc, Mexico). Os solventes hexano e tolueno utilizados foram da Mallinckrodt (Xalostoc, Mexico). O agente complexante pirrolidina dietilcarbamato de amônio (98% APDC) utilizado foi da marca Fluka (St. Gallen, Switzerland). O material de referência certificado para sedimentos marinhos utilizado foi o PACS-2 da National Research Council of Canada, Ottawa, Canadá e para os tecidos o ERM – CE477 (mussels tissue) obtido pelo Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Bélgica.

As soluções-estoque dos padrões analíticos foram preparados em hexano em concentrações de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ (MBT e TPrT), $6\mu\text{g mL}^{-1}$ (DBT), $4\mu\text{g mL}^{-1}$ (TBT) e $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (TeBT). Estas soluções permaneceram armazenadas sob refrigeração (-18°C), em frascos âmbar e renovadas a cada 6 meses.

4.2. Limpeza da vidraria e descarte de resíduos

Todas as vidrarias foram previamente limpas após permanecerem por 15 minutos em banho de ultrassom com Extran®, exaguadas com água purificada em sistema Milli-Q (Millipore) e acetona. Os resíduos gerados na análise foram descartados

em bombonas de 20L devidamente identificadas e encaminhadas para o departamento de resíduos juntamente com a ficha de identificação correspondente. Os frascos de reagente de Grignard também foram armazenados em bombonas de boca larga onde foi adicionado serragem antes do envio para a central de destinação de resíduos do IQ-Unesp Araraquara.

4.3. Sistema analítico e condições cromatográficas

O equipamento utilizado para as análises foi o cromatógrafo a gás (CG) modelo 3800 Varian, equipado com o detector PFPD contendo um injetor automático split/splitless (Autosampler Varian 8200). As condições cromatográficas otimizadas foram baseadas no método proposto por Godoi et al. (2003b) e Cristale et al. (2011) e estão apresentados na Tabela II.1. O cromatograma típico obtido na injeção dos padrões pode ser observado na Figura II.2 (nível 10 da curva de calibração). O tratamento dos resultados obtidos pelo CG-PFPD foi realizado através do software Varian Star 5.3.

Tabela II.1. Condições cromatográficas do CG-PFPD.

Condições Cromatográficas	
Coluna	VF-5ms (30m, 0.25mm, 0.25 μ m, Varian, USA)
T°C coluna	60°C (0.5 min) $\rightarrow$ 15°C/min $\rightarrow$ 170°C $\rightarrow$ 10°C/min $\rightarrow$ 280°C (1.17 min)
Gás de arraste	H ₂ 5.0 analítico Vazão: 1,7 mL min ⁻¹
Injeção	Injeção de Grob (splitless por 1min) volume injetado: 2 μ L temperatura do injetor: 250°C
Deteção	temperatura do detector 300°C filtro: 610 nm H ₂ (mL.min ⁻¹): 13,5 Ar ₁ (mL.min ⁻¹): 17,1 Ar ₂ (mL.min ⁻¹): 10,6 Voltagem da fotomultiplicadora: 730V Gate delay (ms): 3 Gate width (ms): 3 Trigger level (mV): 200

Figura II.2. Cromatograma obtido na injeção de padrões (nível 10) de BTs por GC-PFPD.

4.4. Faixa de Trabalho, linearidade e curva de calibração

A faixa de trabalho utilizada para a análise dos BTs está presente na Tabela II.2. A partir dessas concentrações foi efetuado o teste de Huber (HUBER, 1998; VALENTE, 2009) para verificar a linearidade do sistema analítico no intervalo de concentração considerado.

O teste de Huber consiste na determinação do intervalo linear, calculando-se a Área/Concentração (A/C) para cada composto em cada nível de calibração. Em seguida é calculada a mediana desses valores e calcula-se a diferença entre os valores de A/C e mediana calculando-se a média dos resultados obtidos. O intervalo de confiança é obtido pela multiplicação da média por um fator previamente determinado, que pode variar de 2 a 8, sendo 2 o fator mais restritivo (ICH, 2005). Neste trabalho, a constante utilizada foi $k=3$. Após a construção do gráfico, valores que permaneceram fora desse intervalo foram descartados, pois se encontraram fora da linearidade. As curvas de calibração para cada analito foram construídas a partir dos resultados obtidos pelo teste e construída tendo na ordenada as relações entre as áreas do analito e do padrão interno (A_{BT} / A_{TeBT}) e na abscissa os valores de concentração do analito.

Tabela II.2. Concentrações de BTs dentro da faixa de trabalho.

Nível	Concentração ng mL ⁻¹			
	MBT	DBT	TBT	TPrT
1	10	10	8 ^a	10
2	20	23	16	20
3	40	46	33	40
4	49	59	39	49
5	80	98	65	80
6	100	118	79	100
7	163	196	130	163
8	198	237	158	198
9	297	356	237	297
10	326	395	263	326
11	396	475	316	396
12	495	594	396	495
13	653	784	522	653
14	825	990	660	825
15	990	1188	792	990
16	1155	1386	924	1155
17	2310	2772	1848	2310
18	4620	5544	3696	4620

^a Retirado da curva de calibração devido a ausência de linearidade (ver resultados e discussões).

4.5. Surrogate e Padrão Interno

O surrogate utilizado para a análise de BTs foi o tripropilestano (TPrT). Esse composto foi escolhido devido à sua similaridade estrutural com os analitos de interesse além do fato de não ser encontrado no ambiente. Assim, para avaliar a recuperação do método em cada uma das análises este padrão é adicionado em uma concentração pré-determinada (300 ng mL⁻¹) na matriz e deixado para interagir durante um período de aproximadamente 12h. O padrão interno utilizado para verificar o comportamento de injeção das amostras foi o tetrabutilestano (TeBT), adicionado sempre ao final dos procedimentos analíticos, na concentração de 1 µg mL⁻¹.

4.6. Método para análise de BTs em sedimentos e MPS

O método para análise de sedimentos já havia sido desenvolvido e validado por Godoi et al. (2003a,b) no mesmo laboratório em que as análises deste trabalho foram realizadas. O fluxograma do método utilizado está apresentado na Figura II.3.

Figura II.3. Método utilizado para a análise de BTs em sedimentos superficiais e material particulado em suspensão (GODOI et al., 2003a,b).

Por se tratar de sedimentos em suspensão, foi aplicado o mesmo método para a análise de BTs no material particulado em suspensão, obtendo-se resultados satisfatórios (SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2009). Nesta análise, os filtros correspondentes às amostras foram recortados em pequenos pedaços e colocados em

tubos onde foram adicionados os reagentes de extração, originando um extrato de 2 mL e todo o procedimento seguiu as etapas de análise dos sedimentos superficiais, tendo como extrato final um volume de 0,1 mL.

4.7. Método para análise de BTs em tecidos de bagres estuarinos

No presente estudo foi utilizado uma adaptação do método descrito por Limaverde et al. (2007) e Fernandez et al. (2005), desenvolvido para a análise de BTs em *Stramonita haemastoma*. Dessa forma, por se tratar de um organismo com características distintas dos peixes foram necessários diversos testes para a formulação de um novo método. Os dois métodos estão apresentados na Figura II.4, sendo as principais mudanças incluem o uso do agente complexante, solvente de extração e massa inicial.

Esse mesmo método foi anteriormente adaptado no estudo de Cristale et al. (2012) para ermitões (*Clibanarius vittatus*). Optou-se por utilizar APDC 0,1% em substituição à tropolona devido à disponibilidade no laboratório. Também foi substituída a mistura extratora hexano:éter (2:3) por tolueno, tendo como base o desempenho desse solvente na extração de BTs em demais matrizes ambientais (GODOI et al., 2003b; SANTOS et al., 2009). A avaliação da recuperação, empregando-se o método proposto por Limaverde et al. (2005) aplicado sobre uma amostra de fígado, resultou em uma recuperação de 59 ± 10 para o surrogate (TPrT)

Devido à baixa recuperação, foi adicionada na segunda etapa de extração o ácido acético, obtendo-se em seguida uma recuperação percentual de (82 ± 11) para o TPrT. Para remover o excesso de ácido no extrato, utilizou-se a lavagem com 10 mL de água ultrapura por duas vezes. A massa de tecido utilizada para análise foi otimizada para 0,5 g ao invés de 2 g do método original devido a pouca disponibilidade de tecido e com o objetivo de reduzir o teor de lipídios nos extratos, o que poderia dificultar a extração/recuperação dos analitos.

Figura II.4. Comparação do método utilizado por Limaverde et al. (2007) e Fernandez et al. (2005) e o dele adaptado para a análise de BTs em tecidos de bagres estuarinos.

4.8. Limites de Detecção e Quantificação do sistema

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do sistema (GC-PFPD) foram baseados no teste de Huber, sendo o primeiro valor fora da linearidade correspondente ao LOD e o primeiro valor dentro da linearidade, o LOQ.

4.9. Precisão e Exatidão

A precisão do procedimento analítico foi estimada a partir de triplicatas, do procedimento analítico e injeções e expressa como o coeficiente de variação (CV) de nove (9) resultados (triplicata do tratamento x triplicata da análise). Para o cálculo do CV utiliza-se o valor do desvio entre as amostras multiplicado por um fator de 100 e dividido pela média entre as medições (INMETRO, 2010).

Para verificar a exatidão do método adotado para sedimentos foi utilizado o Material de Referência Certificado PACS-2. Devido à indisponibilidade do material de referência sugerido no projeto: NIES-11 específico para a quantificação de BTs em tecidos de peixes, optou-se pelo uso do material ERM-CE477 fabricado para a dosagem desses compostos em tecido de mexilhão. Também foram realizados ensaios de recuperação utilizando amostras enriquecidas com os analitos em três (3) concentrações diferentes para cada uma das três (3) espécies de bagres estuarinos avaliadas (*C.spixii*, *A.luniscutis* e *G.genidens*) assim como para os sedimentos.

4.10. Limites de detecção e quantificação dos métodos

Para o método de sedimentos superficiais, devido à ausência de efeito matriz (ver seção 5.3.1), são utilizados os valores obtidos pelo sistema, divididos por dois (2), em virtude do uso de 2g de sedimento nas análises. Para o MPS também foram utilizados os valores obtidos no sistema. Entretanto, como a concentração de material particulado varia em 1L de água, os limites foram calculados a partir de uma média de massa do MPS (~0,05 g) e levando também em consideração a concentração do extrato final, que foi de 0,1mL. Para o cálculo do limite de detecção do método para os tecidos (LD) foi utilizada a proposta de Thier & Zeumer (1987), que utiliza a equação disposta no Quadro 1 a seguir. O limite de quantificação do método (LQ) foi baseado nos critérios do ICH, (2005) que corresponde ao menor valor de fortificação onde a recuperação obtida foi superior a 70% e o desvio padrão relativo (CV) foi menor do que 20% (precisão).

Quadro 1:

$$LD = \frac{2 \times t_{f,95} \times \sigma_{com}}{S} \quad \sigma_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_A^2 + (n-1)\sigma_B^2}{m+n-2}}$$

sendo: σ_A - desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação.
 σ_B - desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra controle.
 m - número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação.
 n - número de repetições da aplicação do método à amostra controle.
 f - número de graus de liberdade, estimado por $m + n - 2$.
 S - sensibilidade do método analítico, estimado pela média das concentrações obtidas no estudo de recuperação e pelo menor nível de fortificação.

4.11. Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado pela construção de curvas analíticas no extrato da matriz, em comparação com as curvas construídas com os padrões em solvente. Para as amostras de sedimento foi utilizada uma curva contendo sete (7) pontos e para fígado e brânquias cinco (5) pontos da curva de calibração conforme apresentado na Tabela II.2. Os pontos já derivatizados foram adicionados a etapa final de extração da matriz, utilizando os métodos apresentados no Quadro 2.

Quadro 2:

$$1) \% \text{ efeito matriz} = \left(\frac{\delta_{\text{matriz}} - \delta_{\text{solvente}}}{\delta_{\text{solvente}}} \right) \times 100$$

$$2) \text{ CV (\%)} = \left(\frac{\overline{Xa}}{\overline{Xb}} \right) \times 100$$

onde:
 $\delta \rightarrow$ coeficiente angular da curva de calibração;
 $\overline{Xa} \rightarrow$ desvio padrão entre a área/concentração obtida em cada ponto da curva na matriz e no solvente;
 $\overline{Xb} \rightarrow$ média entre a área/concentração obtida em cada ponto da curva na matriz e no solvente.

No método 1, a avaliação foi feita através do coeficiente angular da equação obtida na regressão linear da curva. De acordo com Thompson et al., (2002) o efeito matriz pode promover uma influência positiva ou negativa na sensibilidade dos resultados portanto pode ser calculado através da diferença entre o coeficiente angular da curva feita na matriz e no solvente, multiplicada por 100, sendo aceitável uma diferença de até 10%. Já o método 2, utiliza a comparação ponto por ponto da curva de calibração utilizando-se o CV(%) obtido entre a área/concentração na matriz e no solvente, onde a diferença deve ser inferior a 20% (INMETRO, 2002; CARDOSO et al., 2008).

5. Resultados e Discussões

5.1. Linearidade, curva de calibração e limites do sistema analítico

A linearidade do sistema analítico após a aplicação do teste de Huber pode ser observada na Figura II.5. Os valores que se apresentaram fora da faixa de linearidade não foram incluídos na construção da curva analítica cujos parâmetros obtidos podem ser visualizados na Tabela II.3. O CV gerado em cada um dos pontos da curva realizada em triplicata analítica e de injeção (n=9 injeções por ponto) manteve-se abaixo de 20% garantindo a repetibilidade do sistema analítico.

Figura II.5. Teste de Huber para a avaliação da linearidade do sistema analítico para BTs.

Tabela II.3. Tempo de retenção (t_R), faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) obtidos na curva de calibração dos BTs (n=3).

Analito	t_R - min.	Faixa de Trabalho ng mL ⁻¹	Equação da reta	r^2
MBT	11.17	20 a 4620	$y=0,0005x- 0,1264$	0,90
DBT	10.44	10 a 5544	$y=0,0008x- 0,0332$	0,99
TBT	9.71	16 a 924	$y=0,0007x+0,0238$	0,97
TPrT	7.84	10 a 1155	$y=0,0006x- 0,0252$	0,97

No geral, os trabalhos de monitoramento ambiental não apresentam os resultados obtidos na curva de calibração ou linearidade do sistema analítico apesar desse parâmetro ser essencial para a quantificação dos compostos de interesse (ABALOS et al., 1997). Além disso, em alguns estudos a faixa de trabalho sequer abrange as concentrações reais detectadas no ambiente. Dessa forma, os erros encontrados nas curvas analíticas podem ser propagados e levando a resultados equivocados sejam eles sub ou superestimados.

Os coeficientes de correlação das curvas obtidas podem se considerados de acordo com os valores (acima de 0,90) indicados pelo INMETRO (2010), mesmo para o MBT. O MBT, devido à sua polaridade, costuma apresentar desempenho analítico inferior aos demais BTs (LEEMARKERS et al., 2005).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais (CG-PFPD), determinados de acordo com a seção 4.6, encontram-se na Tabela II.4 sendo os valores expressos em picogramas (pg), de acordo com a massa injetada no sistema analítico, contida em 2µL do extrato.

Tabela II.4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais, obtidos para o sistema GC-PFPD utilizado neste trabalho. Expressos em pg.

BTs	LD	LQ
TBT	32	66
DBT	88	178
MBT	164	330

Em estudos anteriores utilizando o mesmo sistema analítico, foram encontrados resultados semelhantes envolvendo o estudo de BTs sedimentos superficiais (SANTOS et al., 2010) e em tecidos do ermitão *Clibanarius vittatus* (CRISTALE et al., 2011). Esses resultados demonstram a repetibilidade da resposta do sistema analítico empregado através da precisão intermediária para os padrões ao longo de pelo menos 4 anos utilizando-se o mesmo equipamento e o mesmo procedimento de análise (INMETRO, 2010).

5.2. Precisão e Exatidão do método

5.2.1. Sedimentos

O teste de recuperação para o método de sedimento foi realizado com o material de referência certificado para sedimentos marinhos (PACS 2). Na Tabela II.5 estão os resultados obtidos neste procedimento.

Tabela II.5. Resultados de recuperação obtidos com o método para o material de referência certificado (PACS-2). Expressos em g kg^{-1} (n=9).

	Valor Certificado	Obtido	Recuperação (%)
TBT	$0,890 \pm 15$	$0,986 \pm 0,057$	110
DBT	$1,047 \pm 0,064$	$1,030 \pm 0,265$	98
MBT	(0,6) ^a	$0,620 \pm 0,130$	100

^a de acordo com o fornecedor, este valor é apenas de referência.

Para as análises de recuperação do método foi utilizada uma amostra de sedimento estuarino proveniente de São Vicente (SP) cuja concentração de BTs não foi previamente detectada (SANT'ANNA, 2011). Na Figura II.6 estão os cromatogramas obtidos em uma amostra fortificada e o testemunho contendo o surrogate (TPrT) e padrão interno (TeBT).

Figura II.6. Cromatogramas (GC-PFPD) obtidos na análise de amostra de sedimento de São Vicente-SP. (A) amostra fortificada; (B) amostra testemunha.

Para a amostra testemunha obteve-se recuperação percentual de 88 ± 16 para o surrogate (TPrT). Foram também realizados ensaios de recuperação em três (3) níveis de concentração distintos e a recuperação dos analitos esteve acima de 70% com um CV inferior a 20%.

Durante os ensaios de fortificação notou-se a presença de picos interferentes, coelundo nos mesmos tempos de retenção do TBT e do TPrT. Os cromatogramas estão apresentados na Figura II.7. Montigny et al (1998) também detectaram interferentes nas proximidades do tempo de retenção do TBT em análise por GC/MS. Segundo os autores, a presença desses picos pode diminuir a emissão fotométrica das formas Sn-H devido à presença de ligações C-H em grandes quantidades.

Figura II.7. Cromatogramas (GC-PFPD) indicando a presença de picos interferentes na matriz (amostra de São Vicente – SP). Em destaque: formas características dos picos cromatográficos para diferenciação entre pico de compostos de estanho e pico interferente (compostos sulfurosos).

Os interferentes encontrados em cromatogramas da análise de OTs também são comumente indicados como compostos organosulfurosos voláteis que coeluem no mesmo tempo de retenção do TPrT e ainda fazem com que ocorra uma baixa

recuperação do MBT (WASIK et al., 2007). Além disso, a presença de compostos coeluídos com o surrogate pode levar à variações importantes na resposta relativa dos OTs (MONTIGNY et al., 1998) uma vez que é utilizado para estimativa da eficiência do processo analítico e muitas vezes os valores dos analitos encontrados são corrigidos pela porcentagem de recuperação desse padrão (THOMPSON et al., 1996).

Bravo et al. (2004) também observaram a presença de interferentes a partir da derivação utilizando o reagente de Grignard e, através da identificação por GC/MS constatando a presença de dialquilsulfetos além do enxofre elementar. A presença de butiletilsulfeto (BE_tS_2) também é comumente reportada (Montigny et al., 1998).

Como mencionado na seção 2.4.1., o espectro de emissão do enxofre, hidrocarbonetos (gerados na combustão do detector) e estanho sofrem sobreposição. A identificação de um composto interferente e sua diferenciação frente aos analitos de interesse (BTs) foi discutida por Zulani et al. (2008) em análise por CG-PFPD. De acordo com esses autores, o pico de enxofre possui um formato gaussiano, sendo alto e estreito enquanto o pico de estanho apresenta uma cauda (detalhe da Figura II.7). Esta cauda característica dos compostos de estanho é resultante da deposição de SnO_2 no detector, a partir da combustão química de compostos de Sn (GODOI et al., 2003a).

A interferência de compostos sulfurosos pode ser minimizada ou eliminada pela inclusão de etapas de “clean up” dos extratos como mencionado na seção 2.3. No presente estudo, foram utilizados processos de otimização do “clean up” com diferentes agentes adsorventes (sílica, alumina e florisil) em diferentes quantidades e combinações tal como sugerido por Schubert et al. (1998). Porém, os resultados para este parâmetro não foram satisfatórios, optando-se dessa forma pelo “clean up” *in situ* utilizando o cobre como agente de dessulfurização, procedimento sugerido pelos mesmos autores. Adicionou-se 400 mg de cobre (Cu) ativado em um vial contendo 1mL do extrato. A mistura permaneceu em banho de ultrassom por 10 minutos sendo, a seguir, mantida “overnight” a -18°C .

Os resultados obtidos após a adição de cobre (Cu) em amostras fortificadas podem ser observados na Tabela II.6 e os cromatogramas com e sem a adição de cobre na Figura II.8.

Tabela II.6. Resultados obtidos na utilização de “clean-up” *in situ* com cobre metálico em amostra fortificada (n=3).

Analito	Adicionado (ng mL ⁻¹)	Obtido (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)
TBT	660	572±24	86
DBT	990	723±7	73
MBT	825	698±4	83
TPrT	825	1405±25	124

Figura II.8. Cromatogramas (GC-PFPD) da amostra fortificada com BTs, antes (A) e após (B) o tratamento com cobre ativado.

No entanto, apesar do cobre ter auxiliado na eliminação de compostos sulfurosos, nem todos os sedimentos testados apresentaram recuperação satisfatória. Sedimentos com elevados teores de enxofre, após a adição de Cu ativado apresentaram baixa recuperação do surrogate, com valores em torno de 25%. Como o surrogate possui um papel fundamental no controle analítico para BTs, optou-se por buscar novas alternativas para a eliminação dos interferentes presentes nos cromatogramas de sedimento.

Em análise de BTs hexilados a presença de interferentes nas proximidades dos analitos TBT e DBT foi reduzida a partir da aplicação de cobre ativado combinado ao “clean-up” com o adsorvente C18 (Octadecil) (AL-RASHDI, 2011). De acordo com o autor, com a aplicação do cobre ativado remove-se o enxofre elementar pela formação de sulfeto de cobre enquanto pelo tratamento com C18 os alquilsulfetos são eliminados pela interação com os grupamentos silanóis. Entretanto as recuperações dos analitos também foram afetadas uma vez que atingiram apenas 68% para o DBT e TBT

utilizando o CRM PACS-2, valores muito abaixo do comumente encontrado na literatura.

De acordo com Schubert et al. (1998) nem mesmo a utilização do filtro de 610nm utilizado no detector PFPD ou mesmo o uso do modo SIM do GC/MS são capazes de excluir picos interferentes provenientes de elevadas concentrações de compostos contendo enxofre e evitar assim, a coeluição com os OTs de interesse. A minimização dos interferentes na análise de OTs por GC-PFPD também pode ser testada a partir da mudança dos parâmetros cromatográficos “gate delay” e “gate width” (ZULANI et al., 2008). Assim, a diminuição da interferência foi avaliada alterando-se os “gates” (“delay” e “width”) do sistema de detecção pelos valores sugeridos por Zulani et al., (2008), sendo que o melhor resultado foi obtido com o “gate delay” de 5.0ms e “width” de 4.0ms. O resultado da mudança de “gate” pode ser observada na Figura II.9.

Figura II.9. Cromatogramas (GC-PFPD) da amostra fortificada com TBT e TPrT com diferentes “gates”. (A) “gate” 1 corresponde aos valores de “gates” utilizados no método (3.0ms para “delay” e “width”) e (B) “gate” 2 aos novos valores empregados (5.0 e 4.0ms para “delay” e “width” respectivamente).

A aplicação desse novo método auxiliou na identificação dos picos de estanho coeluídos a compostos sulfurosos, entretanto para amostras intensamente “suja” com elevados teores de enxofre (S) a simples mudança do parâmetro “gates” não resolve o problema, sendo necessários mais alguns testes envolvendo outras técnicas que possam melhorar a resposta cromatográfica. Mesmo após a conclusão do presente trabalho os testes serão realizados.

Devido à presença de interferentes nos cromatogramas de sedimentos foi desenvolvido em seguida, um estudo de efeito matriz para verificar se os componentes da matriz afetam a resposta analítica de alguma maneira. Os resultados estão expostos e discutidos na secção 5.4.

5.2.2. Tecidos

A precisão e exatidão do método foram avaliadas utilizando-se o material de referência certificado CRM 477 para tecidos de mexilhão. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela II.7. Segundo a ICH (2005) recuperações entre 50 e 150% são aceitáveis para amostras complexas, como as biológicas. Desta maneira, os valores encontrados nos ensaios com material de referência são adequados para o TBT e DBT, porém insuficientes para o MBT. Baixos valores de recuperação também foram encontrados por Leermakers et al. (2005) na análise por GC-PFPD sendo eles de 50% e 63% para o DBT e TBT respectivamente conseguindo resultados melhores com a diminuição do pH (de 5 para 4). Apesar de citado no trabalho, nenhum dado de recuperação do MBT foi apresentado neste estudo.

Tabela II.7. Resultados de recuperação obtidos com o método para o material de referência certificado ERM-CE477. Expressos em mg kg^{-1} (n=3).

	Valor certificado	Obtido	Recuperação (%)
TBT	$2,20 \pm 0,19$	$2,16 \pm 12$	98
DBT	$1,54 \pm 0,12$	$0,93 \pm 18$	61
MBT	$1,5 \pm 0,28$	$0,48 \pm 6$	32

Outro fator importante a considerar é que o material de referência corresponde ao tecido de mexilhão e não de peixes, por isso estes valores são apenas indicativos do desempenho do método. Leal et al. (1998), testando diferentes métodos em tecidos de moluscos e no NIES-11 (CRM para peixes) verificaram que as diferentes composições das matrizes avaliadas, principalmente relacionadas ao teor de lipídios, interferiram nas diferentes recuperações encontradas. Para uma avaliação mais fidedigna da exatidão e precisão do método foram utilizadas amostras dos tecidos biológicos em estudo, fortificadas com os analitos, seguindo procedimento recomendado na literatura (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010; ICH, 2005). A fortificação das amostras de *C. spixii*,

G. genidens e *A. luniscutis* correspondem ao ponto 7 da curva de calibração (Tabela II.2) e estão dispostos na Tabela II.8.

Tabela II.8. Porcentagem de recuperação de BTs e CV(%) obtidos para fígado e brânquias das três espécies investigadas neste estudo (n=9).

BT	Massa de amostra (ng)	Recuperação (%)					
		<i>C. spixii</i>		<i>A. Luniscutis</i>		<i>G.genidens</i>	
		Fígado	Brânquias	Fígado	Brânquias	Fígado	Brânquias
TBT	132	72±1	94±8	128±27	87±7	80±6	88±19
DBT	198	65±20	70±15	124±13	82±20	80±41	76±26
MBT	165	88±1	60±7	98±21	87±36	83±24	84±10

Os testemunhos dos tecidos foram analisados e não foi detectada nenhuma concentração de BTs nas amostras de fígado e brânquias de *C.spixii*. Para *G. genidens* foram encontradas concentrações no fígado de 105 e 160 ng g⁻¹ de DBT e MBT respectivamente, para brânquias os valores estiveram abaixo do limite de detecção. Em *A. luniscutis* foi encontrado apenas o DBT no fígado, na concentração de 116 ng g⁻¹. Estes valores foram subtraídos para o cálculo das recuperações.

A adição de padrões na matriz para ensaios de recuperação (“spiking”) é muito utilizada na ausência de material de referência específico para o tecido/organismo alvo de estudo. O uso de agentes complexantes para melhorar a eficiência de extração e consequentemente a recuperação dos analitos principalmente o DBT e MBT também são muito comuns. Narasaki et al. (2000) utilizaram a adição do agente complexante 8-quinolinol na análise de BTs em tecidos de peixes (*Sardinops melanosticus*), encontrando recuperações de 60% para o MBT e, utilizando o CRM NIES-11, a recuperação para o TBT foi de 89%. Sem a adição do agente complexante as recuperações para o MBT e TBT foram de 18.9 e 67% respectivamente.

O uso do surrogate (TPrT) mostrou uma recuperação media foi de 72±9 e 91±12 para brânquias e fígado, respectivamente. Na determinação do teor de lipídios foram encontrados valores médios de 7% e 2% para fígado e brânquias de *C. spixii*, respectivamente. A concentração de lipídios presente nos tecidos de peixes pode permanecer no extrato mesmo após a etapa de “clean-up” e modificar a resposta cromatográfica dos BTs. Além disso, a influência do conteúdo de lipídios e a adsorção dos analitos na matriz podem causar uma menor recuperação. Por este motivo, o uso do surrogate se faz ainda mais importante, pois auxilia no controle de qualidade de cada

procedimento analítico efetuado. Seguindo o cálculo determinado na seção 4.11., o LOD dos tecidos de *C. spixii* pode ser observado na Tabela II.9.

Tabela II.9. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o método proposto na análise de BTs em peixes. Expressos em ng g^{-1} (w.w.).

OTs	LD	LQ
TBT	8	26
DBT	16	24
MBT	7	55

Na Tabela II.10 estão apresentados os resultados obtidos em outros estudos envolvendo a análise de BTs em tecidos de peixes. De acordo com esta tabela, o LD observado em outros trabalhos é menor do que o encontrado no presente estudo.

Tabela II.10. Limites de detecção (LD) de estudos envolvendo a análise de TBT em peixes.

Tecido/Espécie	Extração	Derivação	Análise	TBT-LD ^a	Referência
Fígado (<i>Tilapia nilotica</i>)	HCl/Acetona	Grignard	GC-FPD	0,34	Kannan et al., 1995
Fígado (<i>Multus barbatus</i>)	HAc/ Hexano	NaBEt ₄	GC-FPD	5	Morcillo et al., 1997
Brânquias/Fígado (<i>Mora moro</i>)	HAc/ Hexano	NaBEt ₄	GC-FPD	1	Borghi & Porte, 2002
Músculo (várias spp.)	HCl/Acetona/ Benzeno	Grignard	GC-MS	0,45	Lee et al., 2006
Músculo (<i>C. stigmatias</i>)	HCl/ Metanol	NaBEt ₄	GC-MS	0,8	Hu et al., 2006
Músculo (<i>Chanos chanos</i>)	HCl / KOH/ Isooctano	NaBEt ₄	GC-PFPD	0,5 a 4,2	Tang & Wang, 2007
Músculo (várias spp.)	HAc/Isooctano	NaBEt ₄	GC-MIP-AES	0,2	Guérin et al., 2007
Músculo/brânquias (<i>Oncorhynchus masou</i>)	HCl / MeOH/ Acetato de Etila	NaBEt ₄	GC-MS	0,36	Ohji et al., 2007
Fígado/Brânquias	HAc/ Tolueno	Grignard	GC-PFPD	8	Este trabalho

^aexpressos em ng g^{-1} (w.w.)

Um dos fatores a considerar é que a maioria dos artigos na literatura não menciona como foram obtidos estes limites, sendo frequente o uso de um simples cálculo através da relação sinal/ruído ou empregando o fator de concentração propiciado

pelo tratamento da amostra sobre o valor dos limites instrumentais, que por sua vez também não são obtidos com o rigor estatístico aqui empregado (teste de Huber).

O uso do reagente de Grignard como agente derivatizante pode, em muitos casos, originar maiores níveis de detecção para OTs em amostras biológicas quando comparados com a etilação utilizando-se NaBEt_4 (LISCIO et al., 2009). Entretanto, baixas recuperações podem ser obtidas também através da etilação devido ao comportamento de forte interação entre os compostos organoestânicos e a matriz (TANG & WANG, 2007).

Uma vez que as concentrações reportadas na literatura para os tecidos estudados é da ordem de ng g^{-1} (LEE et al., 2006) os parâmetros de controle de qualidade testados, com valores dentro da linearidade, podem oferecer suporte para uma aplicação segura do método proposto, uma vez que os níveis ambientais destes compostos encontram-se geralmente acima do LD e LQ encontrados neste trabalho.

5.3. Estudo do Efeito Matriz sobre a resposta do sistema analítico

Na análise do comportamento dos padrões em solvente e nas matrizes testadas: sedimento, fígado e brânquias os tempos de retenção (t_R) obtidos nos cromatogramas não expressam uma diferença visual significativa (Figura II.10).

Entretanto, um estudo mais detalhado foi realizado e os resultados para as matrizes abiótica e biótica serão discutidos separadamente nas próximas seções.

Figura II.10. Cromatogramas (GC-PFPD) obtidos na análise do efeito matriz: (A) padrões dos BTs em solvente (hexano); (B) padrões dos BTs em extrato de sedimento; (C) padrões dos BTs em extrato de fígado; (D) padrões dos BTs em extrato de brânquias.

5.3.1. Sedimentos

O estudo de efeito matriz para os sedimentos foi realizado a partir de sete (7) pontos da curva de calibração adicionados na matriz conforme os procedimentos descritos na seção 4.11. As curvas no solvente e matriz estão presentes na Figura II.11 e as equações da reta e coeficientes de correlação dispostos na Tabela II.11.

Aplicando-se os métodos propostos na seção 4.11. temos como resultado uma não influência da matriz sedimento na resposta cromatográfica, uma vez que a diferença entre os coeficiente angulares (Método 1) foi inferior a 1% e entre os coeficientes de variação (CV) (Método 2) inferior à 20% para os analitos testados. Apesar de não observado no presente estudo, o efeito matriz em sedimentos pode ser influenciado pelos reagentes utilizados no processo de extração ou mesmo resultante do sistema analítico empregado para a análise. Flores et al. (2011) observou uma diminuição do efeito matriz em amostras ricas em enxofre e compostos sulfurosos substituindo o ácido acético por ácido tartárico no processo de extração. Entretanto, ocorreu apenas a diminuição e o efeito ainda permaneceu detectável na análise de BTs por GC/MS. Em

análise por GC-FPD o efeito matriz também foi observado e atribuído à presença de compostos sulfurados, porém não discutido (GALLEGO-GALLEGOS et al., 2006).

Figura II.11. Curvas de calibração obtidas na matriz e no solvente. (A) TBT; (B) DBT; (C) MBT; (D) TPrT.

Tabela II.11. Equações e coeficientes de correlação (r^2) obtidos a partir da construção da curva analítica no solvente e na matriz (sedimento). $n=7$

	Solvente		Matriz	
	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
TBT	$y=0,0011x-0,0589$	0,95	$y=0,0011x-0,0442$	0,98
DBT	$y=0,0011x-0,1483$	0,92	$y=0,0012x-0,141$	0,92
MBT	$y=0,0002x-0,0133$	0,95	$y=0,0002x-0,0259$	0,59
TPrT	$y=0,001x-0,0637$	0,97	$y=0,001x-0,0338$	0,98

Como o efeito matriz não foi observado em sedimentos deste estudo utilizando GC-PFPD, a quantificação dos analitos pode ser feita através da curva construída no solvente assim como os limites podem estar baseados na linearidade obtida na ausência da matriz. Os limites de detecção e quantificação para o método, nas análises dos BTs

em sedimento superficial e MPS estão presentes na Tabela II.12. Os valores foram determinados de acordo com a massa utilizada assim como o volume do extrato final.

Tabela II.12. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método, para sedimento e material particulado em suspensão (MPS). Expressos em ng g^{-1} .

BTs	Sedimento		MPS	
	LD	LQ	LD	LQ
TBT	3,2	6,6	0,08	0,16
DBT	11	22	0,22	0,45
MBT	25	51	0,41	0,82

Apesar dos valores determinados, uma atenção especial deve ser dada para o MBT. Como pode ser observado na Tabela II.11, o coeficiente de correlação para a curva na matriz foi inadequado (0,59), necessitando de um novo estudo para verificar se o seu comportamento é semelhante ao dos demais analitos estudados em relação à matriz. De acordo com Gallego-Gallegos et al. (2006) o MBT está mais fortemente ligado à matriz do que o DBT ou TBT tornando a sua extração e consequente recuperação mais difícil. Além disso, elevados teores de enxofre e carbono orgânico podem afetar negativamente a extração de MBT dos sedimentos (CELEUMANS e ADAMS, 1995). Quanto aos valores de LD e LQ observados para o MBT estes também podem ser considerados elevados e sua quantificação só será possível caso as amostras já estejam em níveis considerados medianamente contaminados (acima de 51 ng g^{-1}). Elevados limites de detecção e quantificação para o MBT podem estar associados ao fato de ele ser o mais polar dos BTs e, por ser menos solúvel em solventes apolares normalmente origina valores de LOD e LOQ mais elevados (FLORES et al., 2011).

Estudos futuros devem ser desenvolvidos com o objetivo de melhorar a eficiência de extração do MBT em sedimentos uma vez que este é um dos produtos de degradação do TBT, comumente encontrado em amostras ambientais, sendo sua recuperação importante para a interpretação de dados de monitoramento ambiental.

5.3.2. Tecidos de *C. spixii*

Para a análise do efeito matriz em tecidos do bagre estuarino foram utilizados cinco (5) pontos da curva de calibração do sistema analítico. As curvas de calibração

sobrepostas (Figura II.12) demonstram uma diferença significativa das inclinações das retas.

Figura II.12. Curvas analíticas (área/PI área x concentração) obtidas para o solvente, brânquias e fígado de *Cathorops spixii* para: (A) TBT; (B) DBT; (C) MBT; e (D) TPrT.

Porém, na aplicação do Método 1 proposto na seção 4.11 a diferença entre os coeficientes angulares foi observada apenas para o fígado, sendo que esta matriz possui uma redução de 37,5% da sensibilidade para o TBT e de 22,2% para o DBT. Já para o MBT, nenhuma diferença significativa foi observada (superior a 10%). As equações e r^2 das curvas obtidas estão apresentadas na Tabela II.13.

Tabela II.13. Equações e coeficientes de correlação (r^2) obtidos a partir da construção da curva analítica no solvente e na matriz (fígado e brânquias). $n=5$

	Solvente		Fígado		Brânquias	
	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
TBT	$y=0,0008x-0,0044$	0,98	$y=0,0005x+0,047$	0,95	$y=0,0008x+0,017$	0,98
DBT	$y=0,0009x-0,021$	0,99	$y=0,0007x+0,016$	0,99	$y=0,0009x-0,0031$	0,99
MBT	$y=0,0001x+0,0156$	0,97	$y=0,0002x+0,015$	0,97	$y=0,0002x+0,024$	0,98
TPrT	$y=0,0007x-0,0005$	0,95	$y=0,0005x-0,0148$	0,96	$y=0,0007x+0,033$	0,93

Aplicando-se a análise do CV (%), Método 2 proposto, são verificadas as diferenças ponto a ponto da curva de calibração (Figura II.13). Dessa forma, apesar de não ter sido observado efeito matriz em brânquias utilizando o coeficiente angular das curvas geradas (Método 1), no Método 2 pode-se constatar esse efeito que pode ser observado na primeira concentração do intervalo linear ($>20\%$) Valores acima de 20% também são encontrados nos demais pontos testados, excetuando-se o ponto 5. Também no fígado foram obtidos 3 pontos com CV acima de 20% envolvendo o analito MBT sendo que para o TBT, utilizando este critério, apresentou o primeiro ponto da curva (menor concentração) com $CV > 20$.

Figura II.13. Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente e no extrato da matriz (tecidos de *C. spixii*): (A) fígado; (B) brânquias. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.

O efeito matriz encontrado pode influenciar na quantificação de BTs nas amostras, principalmente àquelas que estejam próximas aos valores relacionados ao primeiro ponto da curva. Dessa forma, foi então observado o efeito matriz nos dois tecidos testados, fígado e brânquias.

O efeito matriz entre tecidos biológicos foi testado por Cassi (2002), onde não foi observada diferença entre o efeito obtido em tecidos de ostras e peixes, contudo sem comparar os resultados obtidos para os analitos em solvente. Dessa forma, acredita-se que o comportamento dos BTs em tecidos biológicos possa ser o mesmo, variando de acordo apenas com o teor de lipídios de cada tecido estudado. A diferença mais evidente seria então baseada na comparação entre solvente e matriz.

Para exemplificar o possível erro associado, caso não seja efetuado o estudo do efeito matriz em amostras biológicas, foi realizada a análise ($n=3$) de TBT em tecidos

de bagres capturados no estuário de São Vicente (SP) e sua quantificação através da curva no solvente e na matriz.

Os resultados obtidos apresentaram uma diferença de mais de 100 ng g^{-1} entre a quantificação realizada com a curva do solvente (222 ng g^{-1}) e da matriz (335 ng g^{-1}), para amostras de fígado demonstrando que o efeito matriz está presente de forma significativa.

Alguns autores mencionam a existência de uma linearização das curvas no solvente e na matriz também denominada de fator de correção. Dessa forma é possível utilizar a curva feita no solvente desde que os valores quantificados sejam corrigidos pelo fator de correção obtido (PINHO, 2009). Porém, neste estudo optou-se pela quantificação sem esse fator de correção.

Os resultados apresentados na Parte III e IV deste trabalho foram determinados a partir da curva obtida nas matrizes correspondentes (fígado ou brânquias) presentes na Tabela II.13.

6. Considerações do Capítulo II

Partindo-se dos métodos da literatura, propostos para a análise de BTs em tecidos, propôs-se um método que apresenta parâmetros de confiabilidade analítica aceitáveis para o estudo pretendido. Em relação ao já descrito na literatura este método apesar de não contribuir para a otimização da análise de BTs foi submetido a um estudo sistemático e detalhado dos parâmetros de validação analítica, incluindo o estudo do efeito matriz, que indicou a necessidade de que a quantificação seja efetuada empregando-se as curvas na matriz.

Na análise de sedimentos, foi observada a presença de compostos organosulfurados interferentes nos cromatogramas de amostras com elevados teores de enxofre, sendo necessária a aplicação de etapas de dessulfurização. Em amostras onde houve a necessidade apenas de separação entre interferente e analito optou-se pela utilização de um novo método cromatográfico contendo novos valores para “gate delay” e “gate width”, com resultados satisfatórios. As demais amostras, onde o tratamento com cobre ativado elimina o surrogate resultando em uma recuperação abaixo de 70% necessitam de mais estudos para que seja possível a sua quantificação.

Apesar do efeito matriz ter sido observado no estudo de BTs em tecidos (fígado e brânquias), essa interferência não foi observada nos testes envolvendo os sedimentos. Dessa forma, para a quantificação de BTs nos tecidos será utilizada a curva feita na matriz para diminuir o erro associado à essa quantificação. Já para os sedimentos e MPS a quantificação pode ser realizada através da curva construída no solvente.

Capítulo III – Distribuição e comportamento dos BTs em estuários da região sul e sudeste

1. Introdução

O ambiente estuarino e os peixes a eles associados são potencialmente impactados por muitas ações antropogênicas que podem ter uma influência direta nos recursos alimentares, distribuição, diversidade, reprodução, abundância, crescimento, sobrevivência e comportamento tanto de espécies residentes quanto migratórias (VAZZOLER, 1996).

Devido à característica dos peixes de estarem presentes em uma diversidade de habitats dentro de sistemas costeiros e estuarinos, esses organismos estão expostos à contaminação a partir de diversas fontes sejam elas indiretas, por biotransferência, (através da cadeia trófica), ou direta, a partir do ambiente, através da assimilação de xenobióticos presentes na água, sedimento ou material particulado em suspensão. No ambiente estuarino, a distribuição de BTs pode ser influenciada por fatores abióticos tais como temperatura, salinidade, pH, radiação UV, potencial redox, conteúdo de matéria orgânica e granulometria dos sedimentos, que podem determinar a especiação, complexação e biodisponibilidade desses compostos para a biota local (HOCH, 2001).

No Brasil, e em muitas regiões do mundo, apesar do menor fluxo de entrada de BTs em decorrência do banimento das tintas a base de TBT, evidencia-se a necessidade do diagnóstico e monitoramento destes compostos principalmente em matrizes biológicas, onde ainda existe uma lacuna a respeito da ocorrência dos BTs, e seu impacto na cadeia trófica. Estudos existentes no país incluem principalmente a análise de sedimentos superficiais tais como os trabalhos realizados por Godoi et al. (2003b) na costa de São Paulo, Fernandez et al. (2005) na Baía de Guanabara-RJ, Felizolla (2005) na Baía de Todos os Santos-BA, Santos et al. (2009) no Complexo Estuarino de Paranaguá-PR e Oliveira et al. (2010) em 3 estuários de Santa Catarina e Sant'Anna (2011) em sedimentos de regiões intertidais de 25 estuários da região sul e sudeste. Estudos envolvendo organismos incluem quantificação em *Stramonita haemastoma* na Baía de Guanabara, realizado por Limaverde et al. (2007), onde foi observado que concentrações entre 10-20 ng g⁻¹ são suficientes para desencadear o desenvolvimento do imposex; e Castro et al. (2011) em regiões portuárias do Sul do Brasil encontrando níveis ainda mais elevados de BTs em tecidos desse organismo. Na Baía de Todos os Santos-BA, o estudo desenvolvido por Pletsch et al. (2010) avaliou a concentração de BTs nos tecidos da ascidia *Phallusia nigra* encontrando apenas os produtos de

degradação DBT e MBT. Em crustáceos, Sant'Anna (2011) quantificou esses contaminantes em tecidos do ermitão *Clibanarius vittatus* em um estudo envolvendo a ocorrência de intersex nesses organismos e Souza et al. (*dados não publicados*⁴) avaliou a concentração de BTs no anfípode *Caprella danilevski* amostrados na região de Ubatuba-SP. Em vertebrados, Dorneles et al. (2008) avaliou a exposição de cetáceos (*Sotalia guianensis*) provenientes da Baía de Guanabara à concentrações de Sn total no fígado dessa espécie.

Demais estudos de monitoramento envolvem a utilização do biomarcador imposex assim como o grau de desenvolvimento dos caracteres masculinos em fêmeas de gastrópodes (MAGALHÃES et al., 1997; CASTRO et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2002; CAMILO et al., 2004; CASTRO et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2005; FERNANDEZ et al., 2007; CASTRO et al., 2005; LIMA et al., 2006; PINHEIRO et al., 2006; CASTRO et al., 2007; LIMAVERDE et al., 2007; ARRUDA e CORBISIER, 2008; COSTA et al., 2008; CARDOSO et al., 2009; PESSOA et al., 2009; QUADROS et al., 2009; SANTOS et al., 2009; GOMES 2010). Como serão discutidos no capítulo IV, bioensaios avaliando a toxicidade de TBT em peixes (*Hoplias malabaricus*) expostos a diferentes concentrações desse composto já foram realizados no Brasil, entretanto sem a quantificação deste composto nos tecidos desses organismos (FERRARO et al., 2004; RABITTO et al., 2005) assim como estudos ecotoxicológicos envolvendo concentrações ambientalmente relevantes em larvas de *Lytechinus variegatus* (PERINA et al., 2011).

Dessa forma, este é o primeiro estudo realizado no Brasil a respeito da ocorrência de BTs em peixes, embora esta matriz já venha sendo investigada em outros países, como será abordado na discussão deste capítulo. Da mesma forma, também representa um estudo integrado da distribuição dos BTs nos compartimentos estuarinos: sedimento, material particulado em suspensão e tecidos (fígado e brânquias) de peixes, e associação com parâmetros ambientais, sendo importante para a compreensão do fracionamento desses compostos e avaliação da contaminação do estuário como um todo, em virtude da mobilidade desses organismos, comumente considerados como bons biomonitores da contaminação por esses compostos.

⁴ SOUZA, E.F.; SOARES, D.M.; SILVA, R.C.; SANTOS, D.M.; MARCHI, M.R.R.; JACOBUCI, G.B. Potencial de utilização de anfípodes caprelídeos (crustacea-pericarida) como bioindicadores de compostos organoestênicos no litoral norte de São Paulo.

2. Revisão de Literatura

2.1. Estuários

Estuários (do latim: *asetuarium* = mareal) são zonas de transição entre os sistemas continentais e costeiros caracterizados pela elevada produtividade biológica e sujeitos à ação de diversas forças físicas (COSTA, 2011). De acordo com a definição de Dyer, 1997:

“Um estuário é um corpo de água costeiro semi-fechado com interligação livre com o oceano adjacente, estendendo-se rio acima até o limite de influência da maré, sendo que em seu interior a água do mar é mensuravelmente diluída pela água doce oriunda da drenagem continental”

Esses sistemas costeiros constituem um importante elo na ecologia de ecossistemas marinhos, pois é através desses ambientes que passam a maior parte de materiais orgânicos e inorgânicos, particulados e dissolvidos (STEIN, 2011) resultantes do intemperismo dos continentes em direção aos oceanos (SCHETTINI, 2002), disponibilizando minerais e nutrientes essenciais à cadeia trófica (BIANCHI, 2006) tornando-se inclusive responsáveis pelo aumento da produtividade pesqueira na região de costa (PEREIRA-FILHO, 2006). São regiões costeiras também importantes para a proteção, alimentação e reprodução de um número considerável de organismos vertebrados e invertebrados (DANTAS et al., 2010) que utilizam de seus recursos para o sucesso reprodutivo.

Ao longo dos estuários podem ser observadas significativas variações nos principais processos oceanográficos atuantes sendo que cada estuário possui características diferenciadas relacionadas à morfologia de fundo, regimes de maré, descarga fluvial, ação de ondas, ventos e correntes (SCHETTINI, 2002). Possuem, de uma maneira geral, um gradiente horizontal de densidade onde a circulação gravitacional é resultante de movimentos bidirecionais da coluna d'água sendo o fluxo fluvial (menos denso) em direção ao oceano e as águas de origem marinha (mais densas) em direção ao continente (TRUCCOLO, 2009). No entanto, esse gradiente pode ser variável e, de acordo com Pritchard (1967) enquadram-se em 3 diferentes classes: Altamente Estratificados ou Cunha Salina (grande aporte de água doce e baixa

influência da maré); Parcialmente Estratificado (mistura efetiva do aporte de água doce e a ação da maré); Estratificado (grande amplitude de maré comparado ao aporte de água doce ocorrendo em sistemas de baixa profundidade). A complexidade dos sistemas estuarinos é acentuada pelas diversas alterações estruturais resultantes da estratificação, interagindo com as partículas do material em suspensão e sedimentos que serão depositados ao longo do estuário (MIRANDA et al., 2002).

Os padrões de composição e estrutura de comunidades nesse sistema resultam da resposta dos organismos a esse ambiente de mudanças repentinas (SCHWARZ et al., 2007). Essas mudanças podem afetar peixes estuarino-residentes (que completam o ciclo de vida no estuário), transientes (utilizam o estuário como berçário) ou mesmo ocasionais (entram no estuário para alimentação) (DAY et al., 1989).

A riqueza de recursos associada à localização estratégica dos estuários levou a um grande desenvolvimento e intensa ocupação humana nessas áreas (MIZERKOWSKI, 2007), gerando um grande impacto oriundo de uma infinidade de atividades humanas (SCHETTINI, 2002). Dessa forma, ambientes estuarinos são frequentemente considerados como ambientes de grande vulnerabilidade (TRUCCOLO, 2009) constantemente sujeitos a variações ambientais de origem natural ou antrópica (BÉRGAMO, 2000; DAFFORN et al., 2012).

Dentre as atividades humanas de grande impacto para o ambiente estuarino estão às instalações portuárias, pesca predatória e atividades industriais localizadas em seu entorno ou em rios que deságuam nesse sistema (MIZERKOWSKI, 2007). Atividades portuárias são responsáveis por diversos impactos negativos no sistema estuarino tais como: construções de píers que alteram o transporte de sedimentos; geração de resíduos; introdução de espécies exóticas através da água de lastro; e liberação de contaminantes através do uso de tintas anti-incrustantes em embarcações (BURUAEM et al., 2012); além da necessidade de dragagem constante dos canais de navegação o que ocasiona a remobilização de sedimentos contaminados, aumentando a disponibilidade desses compostos para a biota local e contribuindo para dispersão do material particulado contendo esses contaminantes para áreas distantes da fonte de contaminação (FILIPKOWSKA et al., 2011).

Assim, regiões costeiras sofrem uma elevada pressão em virtude da extensiva exploração de seus recursos naturais além do uso incorreto de suas áreas. Essas ações antropogênicas podem alterar as características físicas dessas regiões afetando a quantidade, qualidade e o fluxo de efluentes fluviais que chegam até o estuário

aumentando a intrusão salina (LOITZENBAUHER e MENDES, 2012). A contaminação e degradação de sistemas estuarinos coloca em risco o equilíbrio de um dos ecossistemas mais importantes da região costeira, os manguezais (LUIZ-SILVA et al., 2006).

Como discutido no Capítulo I, estuários são regiões onde o input de compostos organoestânicos costuma ser elevado em virtude das atividades de navegação e entrada de efluentes oriundos de regiões industriais e agrícolas sendo que a taxa de BTs no ambiente dependerá das características de adsorção no MPS e sua capacidade de remoção da coluna d'água (RAMASWAMY et al, 2004). Sedimentos estuarinos agem como depósitos de BTs tornando-se um risco constante para os organismos que vivem em contato direto com essa matriz (ROBERTS, 2012). Através da ressuspensão por processos naturais (bioturbação, ação de correntes e marés) ou antrópicos (dragagens) os contaminantes presentes nessa matriz são liberados para a coluna d'água a partir do MPS e distribuído para outros locais além de se tornarem biodisponíveis também para organismos pelágicos (KNOTT et al., 2009; ROBERTS, 2012).

Dessa forma, para a obtenção do real impacto da entrada de contaminantes no ambiente estuarino faz-se necessária a compreensão das interações dos processos químicos e físicos que agem sobre o sistema indicando como será o comportamento de dispersão e acumulação desse contaminante dentre as matrizes ambientais, sendo indispensável a utilização de um biomonitor capaz de assimilar esses contaminantes de forma eficiente.

2.2. Peixes como biomonitores

Compostos hidrofóbicos persistentes podem ser acumulados em organismos aquáticos através de diferentes mecanismos: via assimilação direta a partir da água e através das brânquias ou pele (bioacumulação), via assimilação de partículas em suspensão (ingestão) e via consumo de alimentos contaminados (biomagnificação) (VAN der OOST et al., 2003).

Devido a sua ampla distribuição em diversos habitats aquáticos, peixes possuem um papel ecológico fundamental na cadeia trófica desses sistemas, sendo considerados como transportadores de energia de níveis mais baixos para níveis mais elevados (VAN der OOST et al. (2003). Dependendo da qualidade do ambiente utilizado para forrageio assim como o hábito de cada espécie, peixes podem estar

expostos à contaminantes de maneiras distintas (COSTA et al., 2004) e seu crescimento e sobrevivência dependerá da capacidade de resposta aos agentes externos (SCHWARZ et al., 2007).

Como discutido no Capítulo I, a biodisponibilidade dos BTs é dependente da disponibilidade físico-química (desorção) e da fisiologia do organismo que irá assimilar o contaminante (RÜDEL, 2003), além do tempo de exposição (FENT, 2006). Os fatores ambientais que influenciam na biodisponibilidade de contaminantes no sistema aquático podem incluir o pH, temperatura, potencial redox, composição e concentração de íons, quantidade de MPS e teor de carbono orgânico (RÜDEL, 2003). De acordo com Fent (1996), em pH=8, as formas TBTOH são predominantes penetrando com maior facilidade através das membranas dos organismos além de estarem mais biodisponíveis.

Compostos orgânicos tais como os BTs, apresentam potencial para bioacumulação, demonstrando uma rápida taxa de assimilação, metabolismo lento assim como baixas taxas de eliminação (FENT e HUNN, 1993). Dessa forma, a bioacumulação desses contaminantes em peixes pode ocorrer tanto através da assimilação diretamente da água, através das brânquias (bioconcentração) ou através da dieta (bioacumulação) (IKEDA e YAMADA, 2003), sendo um balanço entre a assimilação e a depuração (fator de bioacumulação).

Peixes são capazes de bioacumular BTs cerca de duas a três ordens de magnitude (D'AGATI et al., 2006), mesmo quando expostos a baixas concentrações ambientais (ng g^{-1} ou ng L^{-1}) (MEADOR et al., 2002). As concentrações desses contaminantes em peixes tem influência nas taxas de metabolização do mesmo em decorrência do impacto causado no citocromo P450, responsável pela metabolização de xenobióticos (IKEDA e YAMADA, 2003) inibindo esse sistema e, conseqüentemente, alterando a capacidade de acúmulo desses compostos (TANG e WANG, 2008) (ver capítulo IV).

Quando expostos ao TBT, mesmo em baixas concentrações Hartl et al. (2000) verificou que linguados (*Platichthys flesus*) expostos à sedimentos contaminados com 150 ng g^{-1} de TBT apresentaram baixa osmolaridade sanguínea devido à sua ação diretamente na ATPase (FENT, 1996). Peixes bentônicos que estão diretamente relacionados à fauna presente nos sedimentos em decorrência de seus hábitos alimentares (MICHAUD et al., 2006) são capazes de assimilar os BTs através do ambiente em seu entorno (água e sedimento) assim como através da bioacumulação (STRAND e JACOBSEN 2005).

A incorporação de OTs em peixes e demais organismos presentes na dieta alimentar humana, pode vir a estimular a preocupação com seus efeitos sobre a saúde. Além da importância para a saúde humana, sabe-se que muitas espécies juvenis de peixes marinhos podem permanecer durante semanas em regiões estuarinas como um período de adaptação às diferentes salinidades e durante o período em que permanecem nesse sistema, alimentam-se de diversos invertebrados presentes nos sedimentos. A elevada toxicidade do TBT para esses organismos pode resultar na redução ou mesmo desaparecimento de muitas dessas espécies afetando toda a cadeia trófica estuarina (MEADOR et al., 2002) envolvendo não somente peixes, mas também aves e mamíferos. Assim, a compreensão da capacidade de assimilação, seu comportamento e resposta utilizando esses organismos como bioindicadores/biomonitores pode possuir elevada relevância ecológica e para a saúde humana de comunidades expostas a esses recursos.

2.3. Bagres

Bagres são teleósteos, pertencentes à ordem Siluriformes que engloba cerca de 30 famílias e 2200 espécies (NELSON, 1994), com ampla distribuição, atribuída a todos os continentes (SCZEPANSKI, 2008). Podem ser caracterizados a partir de determinadas feições morfológicas tais como corpo nu (sem escamas) envolto por uma pele espessa ou coberto por placas ósseas, presença de um a quatro barbilhões sensitivos, nadadeiras raiadas e bem segregadas sendo o primeiro raio da nadadeira dorsal e peitorais dotado de um acúleo (ferrão) (TEUGELS, 1996) muitas vezes produtor de toxina (MONDIN, 2007).

A família Ariidae, representada pelos bagres marinhos, possui 26 gêneros com cerca de 130 espécies, sendo 20 delas encontradas na costa brasileira (MARCENIUK, 2005). Ocorrem em regiões de águas pouco profundas e de sedimentos não consolidados procurando geralmente a desembocadura de rios para a reprodução (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978) sendo considerados recursos pesqueiros abundantes em zonas costeiras tropicais e economicamente importantes na pesca artesanal (REIS, 1986; FIGUEIREDO e MENEZES, 1978; D'AGATI et al., 2006). Além disso, possuem grande importância ecológica, servindo como mecanismos de armazenamento ou regulação energética dentro do sistema estuarino (HUERTA, 1986).

Com comprimento médio entre 200 e 1200mm (MARCENIUK, 2005), possuem capacidade de dispersão limitada, restritos às águas costeiras (BETANCUR-R et al., 2007). As espécies pertencentes a essa família apresentam habito demersal e comportamento “K” estrategista, com elevado cuidado parental dos machos com a prole (HOSTIM-SILVA et al., 2009). Por permanecerem em contato direto com os sedimentos e, conseqüentemente amplamente expostos a contaminação presente nesta matriz (VAN der OOST et al., 2003), estes representantes da família Ariidae podem vir a indicar tanto o grau de contaminação do ambiente quanto o risco de transferência ao longo da cadeia trófica (D’AGATI et al., 2006).

Em grande parte dos estudos de diversidade ictiológica realizados em estuários brasileiros, os bagres costumam estar dentre as espécies mais abundantes com ampla distribuição temporal e espacial (AZEVEDO et al., 1999; CORRÊA, 2001; ARAÚJO et al., 2002; SCHMIDT et al., 2008). Dentre as espécies mais abundantes estão as abordadas neste estudo e descritas a seguir.

2.3.1. *Cathorops spixii* (Agassiz, 1829)

O bagre amarelo (*Cathorops spixii*) (Figura III.1) distribui-se em toda a costa Brasileira, sendo mais abundante nas regiões Sudeste e Sul (REIS, 1986; EIRAS-STOFELLA e FANK-de CARVALHO, 2002). Além desta denominação, outras também são encontradas ao longo das comunidades ribeirinhas tais como bagre de areia, conguito, iriceca e guriamá (MARCENIUK, 2005). Possui um ciclo de vida completo no ambiente estuarino (FAVARO et al., 2005), sendo dessa forma considerado como tipicamente estuarino residente (COSTA et al., 2004) envolvendo sua reprodução, recrutamento e alimentação (CORRÊA, 2001). São comumente encontrados em regiões mais profundas (SCHMIDT et al., 2008) em sedimentos menos estruturados tais como areia e lama (RIBEIRO NETO, 1993). Uma de suas principais características de identificação está associada aos dentes palatinos granulares grandes e arredondados (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978).

Alimentam-se de principalmente de invertebrados diretamente em contato com os sedimentos, através de forrageio bentônico. De acordo com Oliveira et al., (2005), dentre os principais itens alimentares destacam-se poliquetas, crustáceos (Amphipoda, Stomatopoda, Copepoda e Decapoda), peixes teleósteos, ovos de peixes, algas e moluscos. De acordo com Santos (2004), o item alimentar presente em maior

quantidade no estômago de *Arius spixii* (= *Cathorops spixii*) coletado em Caraguatatuba (SP) foi matéria orgânica proveniente dos sedimentos, sendo esta espécie considerada onívora combinando ingestão de alimento animal e vegetal. A grande quantidade de “taste beds” na região faríngea dos arcos branquiais na direção da abertura oral sugere que a recepção química pode ser utilizada para auxiliar na seleção do alimento na deglutição (EIRAS-STOFELLA e FANK de CARVALHO, 2002). A reprodução da espécie ocorre entre a primavera e o início do verão (MISHIMA e TANJI, 1983; FAVARO et al., 2005).

De acordo com Figueiredo e Menezes (1978) *Cathorops spixii* é uma das espécies de bagres marinhos mais comumente encontrada na costa brasileira, podendo ser encontrada em águas marinhas, estuarinas, lagunas e desembocadura de rios (ABSOLON e ANDREATA, 2009). Devido à elevada abundância e ampla distribuição em sistemas estuarinos, o bagre *C. spixii* vêm sendo utilizado como bioindicador de contaminação desses sistemas, envolvendo estudo com metais (AZEVEDO et al., 2009; BARBOSA, 2010; KIRSCHBAUM, 2010; KURIYOSHI, 2011) e poluentes orgânicos (MAGALHÃES, 2008). Apresenta importância econômica, porém é mais comumente utilizado como fonte de alimentação para comunidades ribeirinhas. Dessa forma, sua representatividade como elo da cadeia alimentar entre o sedimento e o homem é bastante evidente o que torna importante o estudo da qualidade do ambiente em seu entorno (AZEVEDO et al., 2009).

Figura III.1. *Cathorops spixii*. Fonte: planetcatfish.com

2.3.2. *Aspistor luniscutis* (Valenciennes, 1840)

O bagre *Aspistor luniscutis* (Figura III.2) também conhecido como cangatá, bagre-guri ou guri-juba (SCZEPANSKI, 2008) possui um comprimento máximo de 1200mm e distribui-se da Guiana ao Paraná (MARCENIUK, 2005). É comumente encontrado em canais ou regiões mais profundas (SCHMIDT et al., 2008) habitando

preferencialmente sedimentos mais estruturados tais como fundos biogênicos e parcéis⁵ (RIBEIRO NETO, 1993). Seu período reprodutivo foi reportado como primavera por Gomes e Araújo (2004), e entre primavera e verão por Mishima e Tanji (1983). Sua identificação pode ser feita através da placa de dentes associadas ao vômer geralmente fundidas em uma única e larga placa (MARCENIUK e MENEZES, 2007).

Figura III.2. *Aspistor luniscutis*. Fonte: Fishbase.org. Carvalho Filho A.

2.3.3. *Genidens genidens* (Cuvier, 1829)

Comumente conhecido como bagre urutu (SCZEPANSKI, 2008), parerê (RABITTO e ABILHÔA, 1999) (Figura III.3) ocorre na costa leste da América do Sul, das Guianas ao Rio da Prata (ARAÚJO, 1988). Habita águas costeiras rasas (SCHMIDT et al., 2008), com fundos arenosos ou lamacentos (BARBIERI et al., 1992) sendo tipicamente bentônico e residente (RABITTO e ABILHÔA, 1999). Possui comprimento máximo de 350mm (MARCENIUK e MENEZES, 2007) e período reprodutivo no começo da primavera à fim do verão, coincidindo com os períodos de chuva, onde prevalecem as menores salinidades (BARBIERI et al., 1991).

De acordo com (RABITTO e ABILHÔA, 1999) o item alimentar mais abundante verificado em peixes da Ilha do Mel-PR foi sedimento e crustáceos decápodos, com 100% de ocorrência nas amostras analisadas, seguido por anfípodes (50%) e poliquetas (17%). A grande contribuição de sedimentos na dieta alimentar do bagre *G. genidens* observada no estudo de Rabitto e Abilhôa, (1999), refere-se à ingestão acidental do substrato assim como a utilização desse material para a digestão mecânica. Esta espécie possui uma fenda bucal pronunciada que facilita a ingestão de itens inteiros assim como sedimentos.

⁵ Parcéis: Estruturas submersas formadas por rochas e corais.

Figura III.3. *Genidens genidens*. Fonte: Fishbase.org. Claudio Timm.

2.4. Interações ecológicas entre as espécies estudadas

A coexistência de espécies pertencentes a uma mesma guilda de peixes em um ecossistema onde os níveis tróficos e espaços são limitados é possível a partir da adoção de estratégias para que não ocorram exclusões de espécies menos adaptadas devido à sobreposição de nichos (AZEVEDO et al, 1999; AZEVEDO et al., 1998). Dentre essas estratégias estão a exploração de microhabitats, tais como diferentes profundidades (MISHIMA e TANJI, 1983) ou a utilização de mesmo ambiente, porém em períodos distintos (AZEVEDO et al., 1999), assim como observado na adoção de diferentes épocas reprodutivas em regiões de desembocadura de rios (GOMES et al., 1999).

A sazonalidade de bagres Ariidae pode ser controlada por fatores abióticos tais como profundidade, temperatura, salinidade e turbidez (ARAÚJO et al., 2002) ou mesmo obedecer estratégias reprodutivas e alimentícias (ARAÚJO, 1988). No estudo conduzido por Mishima e Tanji (1983) em Cananéia-SP, foi observada a ocorrência das três espécies abordadas neste estudo em diferentes profundidades: *C. spixii* e *A. luniscutis* com maior abundância em canais, com profundidades médias de 9m; e *G. genidens* comumente encontrado em baixios com aproximadamente 3m. Em Sepetiba-RJ e na Baía das Laranjeiras-PR, também foi encontrado o mesmo padrão de distribuição com *A. luniscutis* presente em áreas mais profundas (AZEVEDO et al., 1999; SCHWARZ et al., 2007).

De acordo com Azevedo et al. (1998), existe uma associação positiva de similaridade entre as espécies *C. spixii*/*G. genidens*, *A. luniscutis*/*G. genidens* e *C. spixii*/*A. luniscutis*. Entretanto, segundo o autor, também existe na Baía de Sepetiba-RJ, uma correlação negativa em relação à coexistência de *C. spixii* e *A. luniscutis* pois tamanha semelhança também desencadeia uma competição que, devido à diversidade de recursos não está limitada pelo alimento.

Apesar de serem consideradas espécies eurihalinas (ARAÚJO, 1988), outro fator que pode influenciar na distribuição espacial de espécies semelhantes de bagres é a salinidade (LARA-DOMINGUES et al., 1981). De acordo com Azevedo et al. (1999), em Sepetiba-RJ *C. spixii* e *A. luniscutis* foram mais abundantes em regiões de maior salinidade. Entretanto, Corrêa (2001) observou que a ocorrência de *C. spixii* diminuiu nas épocas do ano com maiores salinidades e altos valores de transparência, deslocando-se para regiões externas da Baía de Guaraqueçaba-PR. Indivíduos adultos de *G. genidens* também estiveram relacionado às maiores salinidades no estuário da Lagoa dos Patos-RS porém os juvenis puderam ser encontrados nas porções intermediárias do estuário (ARAÚJO, 1988). Esse fato pode estar relacionado ao período reprodutivo desta espécie, que ocorre no começo da primavera a fim do verão, coincidindo com os períodos de chuva, onde prevalecem as menores salinidades (BARBIERI et al., 1991). Dessa forma, a presença de *G. genidens* em regiões internas da baía, com menores salinidades está relacionada ao período reprodutivo da espécie (CORRÊA, 2001).

A utilização de uma mesma guilda de peixes no estudo de contaminação por BTs em um ambiente estuarino pode oferecer uma visão geral do comportamento destes compostos em bagres.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Análise de BTs em sedimento, material particulado em suspensão e tecidos (fígado e brânquias) dos bagres estuarinos *Cathorops spixii*, *Aspistor luniscutis* e *Genidens genidens* amostrados em 8 estuários envolvendo a região sul e sudeste brasileira.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a dispersão e degradação desses contaminantes em cada estuário amostrado assim como o fracionamento dentre as matrizes investigadas;
- Verificar as possíveis fontes de contaminação por BTs em cada sistema estuarino em virtude dos resultados obtidos;
- Determinar os processos que influenciam no comportamento dos BTs dentre os sistemas estuarinos investigados a partir dos resultados obtidos;
- Avaliar a assimilação dos compostos entre as diferentes espécies de bagres estuarinos.
- Comparar o impacto de BTs nos estuários investigados com dados previamente reportados no Brasil e no mundo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostragem

As coletas foram realizadas em oito estuários das regiões sul e sudeste Brasileira (Figura III.4.) Foram adotados procedimentos pré-amostragem tais como o preparo dos filtros (fibra de vidro, 0,45 μm , Millipore) para MPS que necessitam ser calcinados (450°C por 2h), pesados e armazenados em envelopes de alumínio ao abrigo da umidade (dessecador). Também foram preparados frascos de vidro para coleta de sedimento e frascos de 1L para a coleta de água previamente limpos com Extran® exaguados com água Milli-Q e acetona.

Em cada um dos oito estuários estudados foram coletadas amostras de sedimento superficial, água para a análise do MPS e bagres em 3 pontos pré-determinados (proximidades de fontes potenciais), onde foi possível a amostragem, no caso de coleta dos organismos. Os detalhes a respeito dos pontos amostrais e dos parâmetros mensurados em campo podem ser observados na Tabela III.1. Nesta tabela, também estão presentes os dados de método de captura dos bagres e a espécie encontrada em cada localidade.

Figura III.4. Localização dos 8 estuários da costa sul e sudeste brasileira investigados.

Tabela III.1. Parâmetros amostrais de água, sedimento e bagres estuarinos nos locais estudados.

Estuário	Data	Ponto	Localização	Lua	Maré/Amplitude ^a	Sedimento		Água			Espécie	Método de Coleta
						prof.(m)	Eh ⁻ (mV)	T(°C)	Sal.	pH		
Itajaí – SC	08/06/10	ITA1	S26°53'395" W48°39'913"	Q	E (0.2 a 0.9)	9,5	-266	X	25	7	<i>G.genidens</i>	Tarrafa
		ITA2	S26°54'119" W48°39'484"		E (0.2 a 0.9)	5	-199	X	20	7	<i>G.genidens</i>	
		ITA3	S26°53'615" W48°40'272"		E (0.2 a 0.9)	4	-148	X	25	7	<i>G.genidens</i>	
Baía da Babitonga -SC	15/12/09	BAB1	S26°13'744" W48°39'387"	S	S (1.5)	10	-286	26	31	7	<i>A.luniscutis</i>	Linha de mão
		BAB2	S26°14'291" W48°39'975"		V (1.5 a 0.1)	14	-155	25	29	7	<i>C.spixii</i>	
		BAB3	S26°11'659" W48°37'158"		V (1.5 a 0.1)	11	56	24	32	7	<i>G. genidens</i>	
Guaratuba – PR	17/12/09	GTB1	S25°52'334" W48°37'400"	S	V (1.3 a 0.0)	8	-225	26	28	7	<i>C. spixii</i>	Linha de mão
		GTB2	S25°49'569" W48°36'162"		E (0.5 a 1.3)	9	-231	27	23	7	<i>C. spixii</i>	
		GTB3	S25°52'376" W48°36'297"		V(1.3 a 0.0)	5,5	-195	26	29	9	<i>G. genidens</i>	
Paranaguá – PR	04/06/09	PNG1	S25°29'136" W48°22'272"	Q	E (0.2 a 1.6)	8,5	-168	18	34	8	<i>C.spixii</i>	Arrasto
		PNG2	S25°24'523" W48°21'241"		E (0.2 a 1.6)	11,5	- 80	18	33	8	<i>C.spixii</i>	
		PNG3	S25°30'001" W48°32'555"		V (1.6 a 0.6)	13	- 198	18	33	8	<i>C.spixii</i>	
Cananéia – SP	16/06/09	CAN1	S25°00'372" W47°54'827"	Q	S (0.4)	7,6	- 263	21	28	8	<i>C. spixii</i>	Arrasto
		CAN2	S24°59'175" W47°53'771"		E (0.6 a 1.1)	8,2	- 297	20	32	8	<i>C. spixii</i>	
		CAN3	S25°02'168" W47°55'093"		V (1.1 a 0.4)	6,1	- 237	21	35	8	<i>A.luniscutis</i>	
Santos – SP	28/10/10	STO1	S23°59'622" W46°17'747"	S	E (0.6 a 0.9)	5,5	- 279	X	31	7	<i>G. genidens</i>	Tarrafa
		STO2	S23°54'850" W46°21'847"		E (0.6 a 0.9)	4,5	- 235	X	27	7	<i>G. genidens</i>	
		STO3	S23°55'100" W43°20'139"		S(0.6)	3,5	- 260	X	20	7	<i>G. genidens</i>	
Sepetiba – RJ	24/11/09	SEP1	S22°56'329" W43°49'247"	Q	E (0.8 a 0.9)	6	- 356	29	31	8	<i>G. genidens</i>	Arrasto
		SEP2	S22°56'276" W43°48'115"		V (1.2 a 0.8)	5,5	- 374	28	32	7	<i>C.spixii</i>	
		SEP3	S22°57'349" W43°48'290"		V (1.2 a 0.8)	6,5	- 311	28	33	7	<i>G. genidens</i>	
Itapemirim – ES	28/11/09	IPM1	S21°00'182" W40°48'193"	Q	E (0.2 a 0.9)	6,4	- 8	24	33	7	<i>C. spixii</i>	Arrasto
		IPM2	S21°00'019" W40°48'548"		E (0.2 a 0.9)	1,5	144	29	0	6	<i>G.genidens</i>	
		IPM3	S20°59'410" W40°49'183"		E (0.2 a 0.9)	2,5	201	30	0	6	<i>G.genidens</i>	

Q: Quadratura; S: Sizígia; E: Enchente; S: estofo; V: vazante.

Os sedimentos superficiais foram coletados utilizando amostrador de fundo (Vanveen), por amostragem composta, contendo três subamostras em cada um dos pontos amostrais de acordo com Santos et al. (2010). No momento da coleta foram mensurados os parâmetros de potencial redox (E_h) e profundidade. Em laboratório, as subamostras foram então liofilizadas, trituradas em almofariz, peneiradas em peneiras com malha de 63 μ m (para a análise da porção fina) e quarteadas.

As amostras de água de fundo foram coletadas utilizando uma garrafa de Niskin (2L). A amostragem também foi realizada em triplicata em cada um dos pontos, porém o quarteamento das subamostras já foi realizado em campo, totalizando uma amostra de 1L por cada ponto do estuário para facilitar a logística de transporte até o laboratório. No laboratório, as amostras de água foram filtradas e os filtros contendo MPS foram secos em estufa a 60°C, pesados para a quantificação de MPS e armazenados em embalagens de alumínio sob refrigeração. A concentração de MPS foi calculada a partir da diferença entre o peso do filtro com e sem amostra (mg) pela quantidade (L) de água filtrada. Em campo foram mensurados valores de pH, salinidade, temperatura e profundidade. Os dados de temperatura da água para Itajaí-SC e Santos-SP não foram registrados.

Para os peixes, foram coletados, sempre que possível, 10 exemplares em cada um dos pontos amostrados referentes a uma das espécies estudadas: *Cathorops spixii*, *Genidens genidens* ou *Aspistor luniscutis*. Em laboratório, foi realizada a dissecação e os tecidos (fígado e brânquias) e o “pool” (n=10) foi armazenado em pacotes de alumínio e congelado (-18°C) até a análise. Em campo, foram empregadas três técnicas amostrais: arrasto de fundo (permitido em apenas alguns locais), tarrafa (possível apenas em locais mais rasos) e linha de mão. As coletas foram realizadas com autorização do SISBIO (Coordenação do Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade), n°. 18305. A identificação das espécies amostradas foi realizada a partir da chave de identificação para bagres marinhos proposta por Marceniuk (2005).

4.2. Áreas de Estudo

4.2.1. Itajaí-SC

O estuário do rio Itajaí-açu está localizado no litoral centro-norte do estado de Santa Catarina e é formado a partir da união dos rios Itajaí-açu e Itajaí-mirim, com uma

extensão total de 70Km (SCHETTINI, 2002) e largura média entre 100 e 300m (TRUCCOLO, 2009). É considerado como do tipo cunha salina uma vez que possui a tendência de exportar os sedimentos para a plataforma adjacente. Dessa forma, não possui uma Zona de Máxima Turbidez, uma vez que ocorre o domínio do processo de advecção fluvial (BORDIGNON e GODDHOSI, 2012). O regime de maré é semidiurno, com amplitudes oscilando entre 0,3 (quadratura) e 1,2m (sizígia) com uma média de 0,8m na desembocadura do estuário. A penetração da cunha salina é de cerca de 18Km e a velocidade das correntes variam entre 0,9 e 0,4m.s⁻¹ na sizígia e quadratura respectivamente podendo atingir valores superiores à 2 m.s⁻¹ (SCHETTINI, 2002).

Os processos sedimentológicos no estuário de Itajaí variam em função do tempo respondendo ao regime de descarga fluvial do Rio Itajaí-açu. O MPS aporta no estuário a partir da descarga fluvial sendo em sua maioria argilas carregadas negativamente, ocorrendo em forma de flocos e agregados de material inorgânico e matéria orgânica. Durante o período de descargas mais baixas, os sedimentos de fundo do estuário são dominados por silte e argila enquanto em períodos de descargas pesadas (700m³ s⁻¹) aumenta o teor de areia nos sedimentos de fundo decorrente do transporte fluvial (BORDIGNON e GODDHOSI, 2012). O clima na região é considerado mesotérmico úmido com temperaturas médias de 21,8°C e precipitação de 1416mm por ano (SCHETTINI, 2002).

Sua importância econômica está voltada para a presença do porto de Itajaí e de Navegantes, localizados nas faixas opostas do estuário. Juntos, esses dois portos movimentaram cerca de 10 milhões de toneladas de materiais em 2011 (ITAJAÍ, 2012) sendo o 3º maior do Brasil em movimento de contêineres e o primeiro em carga refrigerada (OLIVEIRA, 2010). Em seu entorno, também conta com uma variedade de indústrias de processamento de pescado sendo os efluentes de indústrias têxteis, metalúrgicas e de galvanoplastia os agentes considerados poluidores na região (PEREIRA-FILHO, 2006).

Na Figura III.5 podem ser observados os pontos de amostragem do Estuário de Itajaí-Açu assim como as imagens dos locais de amostragem.

Figura III.5. Estuário do Itajaí-Açu-SC e os pontos de amostragem: ITA 1 localizado nas proximidades de estaleiros e marinas; Ponto 2 próximo ao Porto de Itajaí; Ponto ITA 3 próximo à estaleiros. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: Henry henkels, Rodrigo Melo e Helcio H. Hoffmann.

4.2.2. Baía da Babitonga-SC

A Baía da Babitonga está localizada ao norte do estado de Santa Catarina abrangendo os municípios de Joinville, São Francisco do Sul, Garuva, Itapoá, Araquari e Balneário Barra do Sul (CONORATH et al., 2010). Com uma área de 176 Km² (SANTOS, 2009) possui um volume de água em torno de 780 milhões de m³, a baía pode ser dividida em três segmentos: a região do Canal do Linguado, que contorna a Ilha na porção sul; a região do Rio Palmital, ao norte e com características estuarinas em boa parte de sua extensão; e o corpo central da baía propriamente dito (CREMER et al., 2006). Com uma profundidade média de 6m e máxima de 28m possui um regime de maré semidiurno, com amplitudes de 1,3m (SANTOS, 2009) e velocidade de 24 cm.s⁻¹ (SCHETTINI e TRUCCOLO, 1999). O clima é considerado como mesotérmico úmido com precipitação média de 1900 mm (OLIVEIRA et al., 2003).

Os sedimentos da baía classificam-se em mais grossos (areias) e finos (silte e argila) dependendo da profundidade e dos padrões de circulação estabelecidos no

interior do estuário (VIEIRA et al., 2008). Os maiores valores de M.O ocorrem em regiões de baixa hidrodinâmica e geralmente associados às argilas (VIEIRA et al., 2008; CONORATH et al, 2010).

Dentre as atividades econômicas da região destacam-se as portuárias, com a presença dos portos de São Francisco do Sul e Itapoá, pesca e a ostreicultura (VIEIRA et al., 2008). De acordo com a hierarquização dos Portos Marítimos realizada pelo Governo Federal (BRASIL, 2012b), o porto de São Francisco do Sul ocupa a 11ª posição e, em 2010, chegou a movimentar 7.895.429 toneladas de carga com a circulação de 546 navios além dos cerca de 180 navios recebidos pelo terminal particular (SANTA CATARINA, 2012). As principais cargas envolvem óleo vegetal, soja e aço. Já o Porto de Itapoá, com capacidade de movimentação de 300mil contêineres/ano foi inaugurado recentemente, em 2011. Na Figura III.6 estão dispostos os pontos de amostragem na Baía da Babitonga-SC assim como imagens associadas ao estuário.

Figura III.6. Baía da Babitonga-SC e os pontos de amostragem: BAB 1 localizado na face oposta do Porto de São Francisco do Sul (SFS); Ponto BAB 2 próximo ao Porto de SFS; Ponto BAB3 próximo ao Porto de Itapoá. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: Bira, Itamauro e João Carlos Jovedi.

4.2.3. Baía de Guaratuba-PR

A Baía de Guaratuba está localizada ao sul do litoral do Paraná ocupando uma área de 48Km², com 16Km de comprimento no eixo leste-oeste e largura máxima de 10Km (MIZERKOWSKI, 2007). Está localizada na cidade de Guaratuba, com 32.013 habitantes limitando-se na face norte com o município de Matinhos (IBGE, 2012). A baía está localizada na APA de Guaratuba, criada em 1992 para a preservação da fauna, flora, manguezais e sítios arqueológicos (sambaquis) riquezas naturais presentes na região (PARANÁ, 2006a). O clima na região também é considerado subtropical úmido mesotérmico (FORCELINI, 2009) com pluviosidade de 1988mm (TODESCHINI, 2004) e temperaturas médias de 21,1°C (PARANÁ, 2006a). Na Figura III.7 estão os pontos de amostragem da Baía de Guaratuba assim como as imagens de locais próximos aos pontos de amostragem.

Figura III.7. Baía de Guaratuba-PR e os pontos de amostragem: GTB 1 localizado na Barra do Boguaçu; Ponto GTB 2 Poço do Araguaguá; Ponto GTB3 próximo ao trapiche da cooperativa de pescadores. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: Pfahl, Clecio João Tkachechen e Marcos Wasilewski.

É considerado como um estuário estratificado, composto por águas relativamente rasas com uma profundidade média de 6m possuindo regime de marés semidiurno com amplitudes variando entre 0,65 e 1,50m. A descarga das correntes de maré são variáveis dependendo da intensidade e oscilando entre $3,373\text{m}^3\text{ s}^{-1}$ em maré de sizígia e $1,462\text{m}^3\text{ s}^{-1}$ em quadratura (MARONE et al., 2004) sendo o tempo de residência da água de 9,3 dias. De acordo com Zem (2005), os sedimentos da Baía são compostos por areia fina, muito fina e silte grosso e normalmente encontram-se teores de M.O. inferiores à 5%. Em águas superficiais Forcelini (2009) encontrou densidades de seston variando ente $261,9\text{mg L}^{-1}$ na porção interna da baía e um valor mínimo de $17,7\text{mg L}^{-1}$ em outras áreas.

As atividades antrópicas mais observadas na região são a pesca artesanal, maricultura e turismo sendo que o maior impacto é observado no período do verão, quando a densidade da população triplica. Devido ao seu potencial turístico existem diversas marinas, estaleiros e píers localizados em ambas as faces do estuário.

4.2.4. Baía de Paranaguá-PR

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) está localizado no litoral norte do estado do Paraná e é considerado como o terceiro mais importante estuário da costa Brasileira (MARTINS et al., 2010). Compreende uma área total de 612 Km^2 , composto no eixo leste-oeste pelas Baías de Antonina e de Paranaguá e no eixo norte-sul pelas Baías de Laranjeiras, Guaraqueçaba e Pinheiros (LANA et al., 2000). Devido à sua grande extensão, o CEP drena aproximadamente 70% da bacia hidrográfica do Estado (ANJOS, 2006). É considerado como estuário parcialmente estratificado (KNOPPERS, 1987) com profundidade média de 5.4m (MARONE et al., 2005). Possui um regime de maré semi-diurno com amplitudes de até 2,2m (PARANÁ, 2006b). Na região central da Baía de Paranaguá está localizada a Zona de Máxima Turbidez (ZMT), região de grande ressuspensão de sedimentos, e que migra durante o ciclo de maré (MANTOVANELLI, 1999). Na Baía, as correntes de maré podem atingir velocidades de 80cm.s^{-1} durante a enchente e 110cm.s^{-1} durante a vazante (MARONE et al., 1995). A taxa de renovação da água de 3,5 dias (MARONE et al., 2005).

Os sedimentos da Baía podem ser constituídos por areias finas, siltes e argilas sendo uma mistura de material detrítico terrígeno e biogênico (BIGARELLA, 2007). A

densidade de MPS pode variar entre 80 e 250mg L⁻¹ de acordo com as condições hidrodinâmicas bem como depender das características físico-químicas das partículas (MANTOVANELLI, 1999).

O impacto antrópico na Baía está principalmente relacionado à presença dos Portos de Paranaguá e Antonina assim como a descarga de efluentes urbanos e industriais provenientes das malhas fluviais que chegam ao estuário. De acordo com a hierarquização portuária, o Porto de Paranaguá encontra-se na 3ª posição, permanecendo atrás apenas de Santos (1º) e Rio Grande (2º). Segundo dados da ANTAQ (Agência Nacional de Transportes Aquaviários) o Porto de Paranaguá movimentou em 2011 cerca de 41 milhões de toneladas de mercadorias destacando-se o açúcar, soja, fertilizantes, milho e contêineres.

Na Figura III.8 estão os pontos de amostragem ao longo da Baía assim como imagens de regiões próximas a eles.

Figura III.8. Complexo Estuarino de Paranaguá-PR e os pontos de amostragem: PNG1 localizado na porção NO da Ilha do Mel; Ponto PNG2 localizado na Baía das Laranjeiras, próxima à Ilha das Peças; Ponto PNG3 próximo ao Porto de Paranaguá. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: Osmari L. de Moraes; Fabio Cubas, Helfer e Fernando A. Ribeiro

4.2.5. Cananéia-SP

O Complexo Lagunar de Cananéia-Iguape localizado ao sul do estado de São Paulo possui uma área superficial de 135Km² (BÉRGAMO, 2000) e uma extensão de cerca de 170Km (TESSLER e SOUZA, 1998). É composto por um complexo sistema de canais (BÉRGAMO, 2000) contendo quatro grandes ilhas: Ilha de Cananéia, do Cardoso, Comprida e Iguape (KUNIYOSHI, 2011) sendo esta última uma Ilha artificial (CUNHA-LIGNON, 2001), criada a partir da abertura do Canal do Valo Grande (STEIN, 2011). Conecta-se ao oceano através de 3 desembocaduras: Icapara (ao norte), Cananéia (porção central) e Ararapira (ao sul) (CUNHA-LIGNON, 2001). Na Figura III.9 estão os pontos de amostragem assim como as imagens de regiões próximas a eles.

Figura III.9. Estuário de Cananéia-SP e os pontos de amostragem: CAN1 localizado na Ilha do pai do Mato; Ponto CAN 2 localizado no Boguaçu; Ponto CAN3 próximo à saída para a Ilha do Cardoso. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: João Gaspar Rocha, Sidneia e Roberto Tatemoto.

O clima na região é considerado semitropical, com temperaturas médias de 21,4°C e precipitação média de 2000 (KUNIYOSHI, 2011). A região pertence à Área de Proteção Ambiental Federal de Cananéia, Iguape e Peruíbe (APA-CIP), criada em 1984 em virtude da grande importância ecológica desse sistema (BRASIL, 2012b).

Seu regime de maré é semidiurno com amplitudes de 0,83m (sizígia) e 0,13m (quadratura), com velocidades de correntes variáveis dependendo da região do complexo lagunar (MIYAO e HARARI, 1989). Na porção do Mar de Cananéia⁶, a velocidade atinge valores entre 0,5m.s⁻¹ na quadratura e 0,75m.s⁻¹ em maré de sizígia (BÉRGAMO, 2000).

No Canal do Mar de Cananéia, os sedimentos de fundo são predominantemente arenosos (76%). Entretanto, nas proximidades das margens forma-se uma região de baixa energia, ocorrendo a deposição de sedimentos mais finos assim como em direção à Iguape esse padrão ocorre em caráter progressivo (TESSLER e SOUZA, 1998). A densidade de MPS no sistema é bastante variável sendo que maiores valores são encontrados na porção sul do complexo (KUNIYOSHI, 2011). Os valores de MPS (fundo) em Cananéia variam entre 44 e 84mg L⁻¹ no verão e possuem uma média de 65,19mg L⁻¹ no inverno (STEIN, 2011).

De acordo com o IBGE (2010), o município de Cananéia conta com uma população de 12.226 habitantes e sua economia está baseada na pesca, agricultura e extrativismo vegetal e mineral. A atividade pesqueira é basicamente artesanal abrangendo cerca de 5mil pescadores (MENDONÇA, 2007). Apesar de não apresentar atividades com potencial impactante, através do Canal do Valo Grande localizado na região de Iguape, pode ocorrer a entrada de efluentes industriais provenientes do Vale do Ribeira, assim como efluentes agrícolas oriundo da lixiviação de fertilizantes e pesticidas para o sistema.

4.2.6. Santos-SP

O Sistema estuarino Santos-São Vicente está localizado na porção central do litoral do Estado de São Paulo, fazendo parte da região denominada de Baixada Santista (MARTINS, 2005) com uma área total de 835 Km² (SAMPAIO, 2010). A Baía de Santos possui uma barra com 12Km de extensão com uma área total de 30Km²

⁶ Mar de Cananéia: Expressão adotada a partir de 1950 por W. Besnard para designar a porção do Mar Pequeno que banha a Ilha de Cananéia (BÉRGAMO, 2000).

(MAGINI et al., 2007). O sistema estuarino está inserido em 5 cidades: São Vicente, Santos, Cubatão, Guarujá e Praia Grande envolvendo uma população de mais de 1 milhão de habitantes (IBGE, 2012). A área do sistema estuarino contém ecossistemas de grande importância econômica e ambiental como o Canal de São Vicente, de Bertioga e o Canal do Porto de Santos (HARARI e CAMARGO, 1998). O Canal de Santos possui um comprimento de 14Km, largura de 400m (SAMPAIO, 2010) e profundidade em torno de 5 a 13,5m (HARARI et al., 2000). O clima na região é tropical quente e úmido com temperaturas médias de 23,9°C (SAMPAIO, 2010) e pluviosidade em torno de 2000-3000mm.

O estuário é classificado como moderadamente estratificado (SAMPAIO, 2010), com amplitudes de maré variando entre 0,27m na maré de quadratura e 1,23m na sizígia (HARARI et al., 2000) sendo este o efeito de maior importância na circulação do sistema. De acordo com Sampaio (2010), a cunha salina pode ser detectada até aproximadamente 20Km da Baía. As velocidades de correntes atingem entre 40 e 60cm.s⁻¹ (MARCELLINO, 2000). De acordo com Leitão et al. (2008), o tempo de residência da água no canal de Santos é de 4,80 dias no inverno e 0,30dias no verão.

Esse estuário caracteriza-se pelo baixo hidrodinamismo recebendo grande contribuição de sedimentos costeiros (TORRES, 2007), havendo a predominância de sedimentos finos (silte e argila) com traços de areia (SÃO PAULO, 2008). A densidade de MPS foi reportada por Giannini et al., 2009 entre 5,91 e 36,26mg L⁻¹.

Possui o núcleo industrial mais importante do Brasil, o chamado Complexo de Cubatão que conta com 1100 indústrias petroquímicas, siderúrgicas e de fertilizantes (MARTINS, 2005). Dessa forma, a contaminação desse sistema estuarino pode ocorrer a partir da descarga de efluentes industriais além de efluentes urbanos como pontos de introdução de esgotos sem tratamento ou mesmo a partir dos emissários submarinos presentes na região (MARTINS, 2005). O emissário de Santos, inaugurado em 1979, localiza-se a 3900m da Baía e possui uma vazão de cerca de 7mil litros s⁻¹. Os rios Cubatão e Morrão são as principais vias diretas de despejos de efluentes industriais sendo que os efluentes domésticos lixões e aterros sanitários responsáveis pela descarga de poluentes nos rios Cubatão, Cascalho e Casqueiro (LUIZ-SILVA et al., 2006).

O Porto de Santos é o maior da América Latina em movimentação de cargas, atingindo um valor recorde em 2011 com aproximadamente 97 milhões de toneladas (CODESA, 2012) além de possuir uma grande infraestrutura com 14 Km de cais. Possui terminais privados tais como Cosipa, Ultrafertil, Dow Química, Cutrale entre outros. As

cargas mais comuns no Porto de Santos são milho, soja e açúcar exportando para mais de 200 diferentes países, sendo a China o país mais representativo (14% das movimentações) (CODESA, 2012).

Na Figura III.10 estão os pontos de amostragem em Santos-SP assim como imagens de regiões próximas a eles.

Figura III.10. Estuário de Santos-SP e os pontos de amostragem: STO1 nas proximidades do Porto de Santos e Ferry boat; STO2 localizado próximo à Ilha dos Bagres-Alemao-Transpetro; Ponto STO3 próximo à Ilha Barnabé. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: Sergio Furtado e Guilherme Eduardo Hernandez.

4.2.7. Baía de Sepetiba-RJ

A Baía de Sepetiba é um estuário semiaberto com uma área de 447 Km² (BARCELLOS, 1995) localizado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, a 60 Km do centro da capital do Estado (CUNHA et al., 2001). Com uma extensão de 40Km no eixo

leste-oeste e 20Km no sentido norte-sul sua bacia de drenagem compreende os municípios de Itaguaí, Mangaratiba, Queimados, Japiri, Paracambi e porções oeste das cidades do Rio de Janeiro e Nova Iguaçu (BARCELLOS, 1995), conectando-se ao oceano através da Barra de Guaratiba (CUNHA et al., 2002).

O estuário é considerado fracamente estratificado, de água pouco profundas, apresentando cerca de metade da sua área com profundidades inferiores a 6m porém chegando a 20m na entrada da Barra (CUNHA et al., 2002). A amplitude de maré é de 0,3m na quadratura e de 1,10m em sizígia e a velocidade de correntes varia de 50 a 75cm.s⁻¹ (MOLISANI et al., 2004). O tempo de residência da água é de 3 a 4 dias (QUADROS et al., 2009). Na Figura III.11 estão os pontos de amostragem da Baía de Sepetiba-RJ e as imagens de locais próximos a esses pontos.

Figura III.11. Baía de Sepetiba-RJ e os pontos de amostragem: SEP1 nas proximidades do Porto Oposto; SEP2 localizado próximo ao Porto de Itaguaí; Ponto SEP3 próximo à saída do Rio Guandu. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: Alex Souza Adv. e Tony Borrach.

O clima na região é tropical semiúmido com temperaturas médias de 24°C e precipitação média de 1500mm (PELLEGRINI, 2000). Na Baía, os sedimentos finos de origem fluvial estão presentes na porção leste (68%) assim como na porção central, dominada por silte (BARCELLOS, 1995). A densidade de MPS no sistema estuarino

varia entre 80 e 263mg. L⁻¹ (MOLISANI et al., 2004). Uma característica muito importante da região é a sua elevada taxa de sedimentação que, de acordo com Barcellos (1995), varia de 0,8 a 1,3 cm ano⁻¹ (BARCELLOS, 1995).

Constitui um importante criadouro natural para moluscos, crustáceos e peixes (CUNHA et al., 2001). Devido a seus atributos naturais, na região ocorre grande exploração turística com elevado tráfego de embarcações de turismo e pesca (MARTINS, 2008).

As fontes de poluição estuarina baseiam-se na entrada de componentes orgânicos e nutrientes originários de esgotos domésticos, efluentes industriais (cerca de 100 indústrias) e de produção agrícola (BARCELLOS, 1995). De acordo com Cunha et al. (2002), recebe o esgoto proveniente de mais de 1,5 milhão de habitantes, totalizando uma carga aproximada de 378mil m³ dia⁻¹ (CUNHA et al., 2002). Além disso, a região ainda conta com o Porto de Sepetiba localiza-se no município de Itaguaí e conta com um terminal de carvão e alumina (REZENDE et al., 2007) movimentando uma carga de aproximadamente 37 milhões de toneladas/ano (Itaguaí, 2012). Fora do porto, em Mangaratiba existe ainda um terminal privado, a MBR exportadora de minério de ferro e o terminal marítimo da NUCLEP (REZENDE et al., 2007).

4.2.8. Itapemirim-ES

O delta do Rio Itapemirim está localizado no município de Marataízes, litoral sul do Espírito Santo. Possui uma geometria em cúspide, sendo os cordões litorâneos sua expressão principal (SOUZA, 2005). A Bacia do Rio Itapemirim possui uma área de 5913 Km² (SILVA et al., 2011).

O clima é considerado como tropical semiúmido, com temperaturas médias de 24°C e pluviosidade de 1000mm (CESAN, 2012). De acordo com Santos (2005), a amplitude de maré no Estado do Espírito Santo está entre 0,9 e 0,6m, possuindo um regime de micromarés.

O uso do solo nas margens do Rio Itapemirim possui enfoque no cultivo de café e como pastagens, uma vez que o solo é pouco fértil e susceptível à erosão (CESAN, 2012). Problemas ambientais identificados na bacia do Rio Itapemirim são os efluentes urbanos in natura, detritos sólidos e metais pesados oriundos de empresas de corte de mármore (CESAN, 2012). De acordo com o IBGE (2012), a população de Itapemirim é de cerca de 30mil habitantes e de Marataízes aproximadamente 34 mil. Na

Figura III.12 estão os pontos de amostragem do delta do Itapemirim e algumas imagens do local.

Figura III.12. Delta do Itapemirim-ES e os pontos de amostragem: IPM1 entrada da Barra; IPM2 localizado no Cabral do meio; Ponto IPM3 no Cabral pilastra. Fonte: Dalton Sasaki. Fotos: José Eymard e Amoreaxi.

4.3. Granulometria e Teor de Matéria Orgânica

As análises de granulometria e teor de matéria orgânica dos sedimentos foram realizadas no Laboratório de Sedimentologia Marinha do IOUSP seguindo as metodologias propostas por Suguio (1973) e Strickland e Parsons (1968) respectivamente. A primeira trata-se da queima da M.O e CaCO_3 seguido por peneiramento úmido, seco, pipetagem e, por fim peneiramento mecânico por 20 minutos com intervalos de $\frac{1}{2} \phi$ da escala de Wentworth (1922). Já para determinação de M.O total (%), as amostras são submetidas à queima em mufla a 450°C por 4 horas e o resultado é obtido pela diferença de massa obtida antes e após esse procedimento.

4.4. Análise Elementar

Os teores (%) de Nitrogênio (N), Hidrogênio (H), Carbono (C) e Enxofre (S) foram determinados no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) para auxiliar na identificação da composição dos sedimentos e interpretação dos dados de BTs. O equipamento utilizado para as análises foi o Fisons mod. EA 1108 CHNS-O e a quantificação foi realizada através do software Eager 200.

4.5. Análise de BTs

As análises dos BTs nas matrizes sedimento, MPS e biota foram realizadas segundo os procedimentos descritos no Capítulo II deste trabalho. O “pool” de 10 indivíduos, tanto para brânquias quanto para fígado foi analisado 6 vezes ($n_{\text{analítico}}=6$) e injetado 3 vezes ($n_{\text{injeção}}=3$) totalizando 18 análises.

Para a dosagem de lipídios nos tecidos dos bagres estuarinos foi utilizada a metodologia proposta por Folch et al., (1956) baseada na extração de 1g de tecido com 20 mL de solução Metanol:Clorofórmio, retirada de alíquota de 1mL e secagem em fluxo de N_2 , seguida por pesagem e quantificação direta.

4.6. Análise dos dados

A análise dos resultados (sedimento, MPS e tecidos) para cada estuário foi realizada de maneira descritiva, utilizando as características ambientais específicas de cada sistema. Dessa forma, o tratamento estatístico foi aplicado apenas para os resultados integrados. Foi utilizado o índice de correlação de Spearman (r), com significância de $p < 0,05$ sendo consideradas correlações fortemente significativas: $p \geq 0,70$; moderada: p entre 0,3 e 0,7; e fracamente significativa: $p \leq 0,3$. A normalidade das variáveis foi verificada a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov com significância de 0,05%. Todos os parâmetros foram realizados utilizando o programa Statistica 7.0

5. Resultados e Discussões

Os resultados obtidos na análise de BTs nos compartimentos estuarinos foram variáveis em um mesmo sistema estuarino, sendo a complexidade da distribuição dos contaminantes nesses sistemas resultante de sua variabilidade de ambientes, com diferentes composições de sedimento, salinidade, teor de matéria orgânica e hidrodinâmicas distintas.

Nas Tabelas III.2 a III.4, estão presentes os resultados obtidos na análise dos sedimentos e a quantificação dos BTs em todos os estuários. Foi utilizado o BDI (Butyltin Degradation Index) proposto por Díez et al. (2002) para determinar se a degradação no ambiente pode ser considerada recente ou antiga. Como pode ser observado, os resultados de BTs em sedimentos não foram corrigidos pelo teor de matéria orgânica devido à ausência de correlação entre esses dois fatores. Da mesma forma, a concentração desses contaminantes nos tecidos também não foi corrigida pelo teor de lipídios uma vez que o conteúdo lipídico pode ser variável não apenas de acordo com o estágio de desenvolvimento do organismo, mas também de acordo com os momentos de reprodução, ausência de alimento e estresse (ELKUS et al., 2005), criando uma grande variabilidade nos teores lipídicos que pode ser transferida para a concentração de BTs. Além disso, a associação dos diferentes compostos butílicos com os lipídios é dependente de sua polaridade, sendo descrito na literatura que os BTs possuem uma maior afinidade por proteínas do que por lipídios (STRAND e JACOBSEN, 2005). No entanto, os valores foram corrigidos pela recuperação do surrogate (TPrT) para corrigir possíveis perdas dos analitos durante a análise, como discutido no Capítulo II. Os resultados obtidos sem a correção do surrogate, assim como a porcentagem de recuperação do mesmo podem ser observados nos Apêndices de 1 a 4.

Tabela III.2. Resultados obtidos na análise elementar e granulometria dos sedimentos superficiais amostrados nos 8 estuários investigados.

Amostra	%M.O	Análise Elementar (%)				Granulometria (%)				Classificação
		Nitrogênio	Hidrogênio	Carbono	Enxofre	Grânulos	Areia	Silte	Argila	
ITA - 1	9,19	0,12	1,53	1,48	1,15	0	5,57	44,73	49,7	Argila siltica
ITA- 2	4,9	0,19	1,16	3,60	0,53	0,07	62,22	22,28	15,43	Areia siltica
ITA- 3	7,35	0,13	0,91	1,39	0,52	0	25,4	54,26	20,35	Silte arenoso
BAB- 1	14,83	0,34	1,12	3,25	1,043	0,05	12,45	40	47,5	Argila siltica
BAB- 2	9,91	0,31	1,099	3,43	0,94	0,11	29,46	30,45	39,97	Argila siltica arenosa
BAB- 3	1,59	0,0072	0,34	0,0087	0,20	2,17	97,83	0	0	Areia
GTB- 1	9,38	0,11	0,44	0,71	0,25	0	53,81	25,66	20,53	Areia siltica
GTB- 2	8,88	0,12	0,94	0,39	0,21	0,54	15,2	18,54	65,72	Argila siltica
GTB- 3	1,65	0,25	0,77	2,38	0,61	0,03	94,81	3,44	1,72	Areia
PNG- 1	4,76	8,45E-02	0,61	1,095	0,58	0	70,69	13,79	15,52	Areia argilosa
PNG- 2	1,16	9,69E-03	0,44	4,07E-02	0,29	0	100	0	0	Areia
PNG- 3 ^a										
CAN- 1	13,07	0,105	0,67	1,32	1,01	0	57	17,2	25,8	Areia argilosa
CAN- 2	4,99	4,20E-02	0,50	0,64	0,57	0,27	72,37	10,26	17,1	Areia argilosa
CAN- 3	2,44	6,46E-02	0,50	0,65	0,42	0,14	89,63	3,41	6,82	Areia
STO- 1	17,5	0,19	0,84	2,45	0,88	1,17	34,94	34,53	29,35	Areia siltica argilosa
STO- 2	7,07	0,17	0,66	1,77	0,95	0	51,89	25,77	22,34	Areia siltica
STO- 3	13,23	0,17	0,85	2,92	1,52	2,85	31,43	35,67	30,04	Silte argilo arenoso
SEP- 1	4,5	0,15	0,57	0,66	0,65	0	73,39	9,98	16,63	Areia argilosa
SEP- 2	17,36	0,23	1,16	1,65	1,54	0	3,85	41,67	54,49	Argila siltica
SEP- 3	17,59	0,27	1,19	1,40	1,38	0	2,99	20,21	76,8	Argila
IPM- 1	0,94	0,0062	0,32	0	0,18	0,34	99,66	0	0	Areia
IPM- 2	0,23	0,0072	0,97	0,0026	0,18	0,59	99,41	0	0	Areia
IPM- 3	0,49	0,0012	0,28	0	0	3,58	96,42	0	0	Areia

^a não analisado

Tabela III.3. Resultados obtidos na análise de BTs em sedimentos superficiais e material particulado em suspensão (n=3).

Amostra	Sedimento (ng g ⁻¹ d.w.)						MPS (ng L ⁻¹)						
	TBT	DBT	MBT	ΣBTs	%TBT	BDI	[MPS] mg L ⁻¹	TBT	DBT	MBT	ΣBTs	%TBT	BDI
ITA -1	a	a	a	c	c	c	141,6	a	a	a	d	c	c
ITA -2	229±21	31±3	n.d.	260	88	0,1	37,7	<LQ	5	<LQ	5	c	c
ITA -3	<LQ	n.d.	<LQ	c	c	c	101,2	a	a	a	d	c	c
BAB -1	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	191	2,17	n.d.	60	62,17	3,5	27,6
BAB -2	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	38,96	4,5	n.d.	41	44,5	10	9,1
BAB -3	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	114,22	n.d.	n.d.	53	53	c	c
GTB -1	<LQ	n.d.	n.d.	c	c	c	111,2	n.d.	n.d.	121	121	c	c
GTB -2	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	60,44	n.d.	n.d.	n.d.	d	c	c
GTB -3	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	79,98	25	8	137	170	14	5,8
PNG- 1	n.d.	26±10	64±17	90	0	c	54,9	54	106	166	326	16	5,0
PNG-2	<LQ	n.d.	n.d.	c	c	c	55,3	32	25	89	146	22	3,5
PNG -3	279±33	<LQ	289±0,5	568	49	1,03	62,2	a	a	a	d	c	c
CAN -1	<LQ	19±8	n.d.	19	0	c	38,8	7	5	<LQ	12	58	0,7
CAN -2	<LQ	n.d.	n.d.	c	c	c	36,5	6	<LQ	<LQ	6	100	c
CAN -3	<LQ	n.d.	n.d.	c	c	c	25,2	7	4	<LQ	11	63	0,5
STO -1	26±4	63±4	n.d.	89	29	2,4	11,3	50	7	<LQ	57	87	0,14
STO -2	n.d.	25±7	n.d.	25	0	c	13,49	76	4	<LQ	80	95	0,05
STO -3	n.d.	30±6,5	<LQ	64	0	c	23,95	25	4	<LQ	29	86	0,16
SEP -1	n.d.	338±14	<LQ	381	0	c	61,32	8	25	16	49	16	5,1
SEP -2	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	297,37	a	a	a	d	c	c
SEP -3	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	105,05	36	9	175	220	16	5,1
IPM -1	<LQ	n.d.	n.d.	c	c	c	441,5	34	n.d.	n.d.	34	100	c
IPM -2	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	19,47	28	n.d.	n.d.	28	100	c
IPM -3	n.d.	n.d.	n.d.	c	c	c	94,56	n.d.	n.d.	n.d.	d	c	c

^a Amostra suja; ^b Amostra inexistente; ^c Não se aplica; n.d. não detectado; <LQ abaixo do limite de quantificação (vide Tabela II.12).

Tabela III.4. Resultados obtidos na análise de BTs no fígado e brânquias de bagres estuarinos amostrados (n=10).

Amostra	Fígado (ng g ⁻¹ w.w.)							Brânquias (ng g ⁻¹ w.w.)					
	% LT	TBT	DBT	MBT	ΣBTs	%TBT	BDI	TBT	DBT	MBT	ΣBTs	%TBT	BDI
ITA -1	21	432±8	1426±25	458±14	2316	18	4,3	129±13	<LQ	n.d.	129	100	^c
ITA -2	24	78±8	<LQ	n.d.	78	100	^c	71±5	n.d.	n.d.	71	100	^c
ITA -3	^a	^a	^a	^a	^c	^c	^c	^a	^a	^a	^c	^c	^c
BAB -1	17	77±29	n.d.	n.d.	77	100	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
BAB -2	19	66±13	n.d.	n.d.	66	100	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
BAB -3	14	124±15	35±9	<LQ	159	77	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
GTB -1	18	65±11	45±4	94±13	204	31	2,13	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
GTB -2	21	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
GTB -3	16	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c	72±7	n.d.	n.d.	72	100	^c
PNG- 1	9	66±12	107±6	n.d.	173	38	1,62	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
PNG-2	19	121±9	178±17	n.d.	299	40	1,4	n.d.	27±7	218±35	245	^c	^c
PNG -3	14	71±8	302±30	n.d.	373	19	4,2	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
CAN -1	15	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c	^b	^b	^b	^c	^c	^c
CAN -2a	14	n.d.	455±23	n.d.	455	^c	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
CAN -2b	^b	57±12	n.d.	n.d.	57	100	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
CAN -3	10	89±10	n.d.	n.d.	89	100	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
STO -1	12	102±10	91±18	<LQ	193	52	0,89	59±15	n.d.	n.d.	59	100	^c
STO -2	17	n.d.	221±14	n.d.	221	^c	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
STO -3	13	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
SEP -1	12	110±27	18±17	<LQ	128	85	0,16	81±26	n.d.	n.d.	81	100	^c
SEP -2	19	<LQ	58±10	n.d.	58	^c	^c	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
SEP -3	13	n.d.	n.d.	n.d.	^c	^c	^c	58±8	n.d.	n.d.	58	100	^c
IPM -1	17	80±14	<LQ	n.d.	80	100	^c	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
IPM -2	16	56±14	<LQ	n.d.	56	100	^c	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c
IPM -3	12	43±13	n.d.	n.d.	43	100	^c	<LQ	n.d.	n.d.	^c	^c	^c

^a amostra inexistente; ^b amostra insuficiente; ^c não se aplica; n.d. não detectado; <LQ abaixo do limite de quantificação (vide Tabela II.9); CAN 2a: *Cathorops spixii*; CAN 2b: *Aspistor luniscutis*.

Como mencionado anteriormente, devido à grande variabilidade de composições, os estuários foram avaliados primeiramente de maneira independente para a obtenção dos fatores ambientais que influenciam a distribuição dos BTs em cada sistema além da identificação das fontes pontuais e difusas desses contaminantes.

Em seguida, foi realizada uma avaliação integrada dos resultados, utilizando índices de correlação e análise de componentes principais para verificar as variáveis que podem ser atuantes na distribuição desses compostos em sistemas estuarinos assim como uma avaliação a respeito da assimilação desses compostos pelas diferentes espécies de bagres utilizadas nesse estudo.

5.1. Itajaí- SC

Como pode ser observado na Figura III.5, os pontos ITA1 e ITA 3 são muito próximos, possuindo a mesma salinidade (25 psu), porcentagens semelhantes de matéria orgânica, nitrogênio, carbono assim como seleção dos grãos semelhantes, embora sejam designados diferentemente como argila siltica (ITA1) e silte arenoso (ITA3). Apesar das características em comum, o teor de enxofre (S) é muito superior na amostra ITA1 (1,15%) em relação à amostra ITA3 (0,52%), o que provavelmente dificultou a quantificação dos BTs por GC-PFPD nas amostras de sedimentos superficiais conforme discutido no Capítulo II deste trabalho.

A concentração de MPS nas amostras ITA1 e ITA3 foram 141,6 e 101,2 mg L⁻¹ respectivamente. De acordo com Bordignon e Goddhosi (2012), a concentração dos sedimentos em suspensão na região pode variar bastante desde 7mg L⁻¹ em períodos de menor descarga até 500mg L⁻¹ em períodos de maiores descargas sendo a distribuição associada aos gradientes de salinidade (SCHETTINI, 2002). Como a amostragem foi realizada durante a enchente, a concentração do MPS encontrado pode ser resultante da ressuspensão dos sedimentos ocasionada pela força da maré.

A amostra (ITA1) foi coletada em uma profundidade superior aos demais pontos deste estuário, com cerca de 9,5m de profundidade. Em regiões mais profundas comumente encontram-se potenciais de oxi-redução inferiores assim como o demonstrado para este ponto (-226mV) e confirmado pelo elevado teor de enxofre encontrado nessa amostra. Apesar da impossibilidade de quantificação dos BTs nesse sedimento, este seria propenso à adsorção de contaminantes devido às suas características tais como elevada composição de silte (44%) e argila (49%), onde o TBT

poderia estar preservado devido às condições redutoras do sedimento. Além disso, por se tratar das redondezas de um estaleiro poderia ser considerado um possível “hotspot” para BTs nesse estuário. Nessa região existem diversos estaleiros que podem ser observados pelas imagens de satélite.

Essa possível contaminação das matrizes abióticas do ponto ITA1 também é sugerida em decorrência da presença dos analitos de interesse nos tecidos do bagre *G. genidens* amostrados nesse local. Os resultados obtidos em ng g^{-1} para TBT (432 ± 8), DBT (1426 ± 25) e MBT (458 ± 14) no fígado, foram os maiores encontrados dentre todos os estuários investigados no presente estudo. O cromatograma dessa amostra pode ser observado no Apêndice 5. Além do fígado, também foi o maior valor registrado para TBT nas brânquias, com $129 \pm 13 \text{ ng g}^{-1}$, fato que pode inclusive estar associado à ressuspensão dos sedimentos nesse local e consequente adsorção nos tecidos branquiais.

Elevadas concentrações de BTs foram encontradas em um estudo realizado por Oliveira et al. (2010) em sedimentos superficiais em um dos pontos amostrais bastante próximo à amostra ITA1 desse trabalho. Neste estudo as concentrações de TBT, DBT e MBT foram respectivamente de 1136, 36 e 94 ng Sn g^{-1} .

Apesar da proximidade, a quantificação de BTs na amostra de sedimentos superficiais de ITA 3 foi possível muito provavelmente pela menor interferência de compostos sulfurados nessa amostra em comparação à amostra ITA1. Esse ponto, assemelha-se com o ponto ITA 4 do estudo desenvolvido por Oliveira et al. (2010) porém os autores encontraram apenas o TBT nessa amostra e em concentrações elevadas (578 ng Sn g^{-1}). Essa região também apresenta uma série de marinas e estaleiros, onde os sedimentos possuem os maiores teores de silte dentre as três amostras. Entretanto, a amostragem no presente trabalho foi realizada em uma região de baixa profundidade (4m) o que proporciona uma taxa de degradação dos BTs (influenciada pela fotodegradação UV) maior do que a possivelmente encontrada em regiões com uma maior profundidade de coluna d'água (LANGSTON et al., 2009).

Para a amostra ITA 2, foi quantificado o TBT ($229 \pm 21 \text{ ng g}^{-1}$) e DBT ($31 \pm 3 \text{ ng g}^{-1}$) em sedimentos superficiais e também este último no MPS (5 ng L^{-1}). Essa amostra localiza-se nas proximidades da desembocadura do estuário, em frente à cooperativa dos pescadores e ao Ferry Boat e é caracterizada por um maior teor de areia na sua composição (62%). No estudo de Oliveira et al. (2010) também foram encontradas concentrações de TBT elevadas nessa região (806 ng Sn g^{-1}). Nos tecidos do bagre *G. genidens* amostrados nesse ponto foram detectados níveis de TBT com concentrações

de 78 ± 8 e 71 ± 5 ng g⁻¹ em fígado e brânquias respectivamente, indicando a biodisponibilidade desse contaminante para a biota. Os teores de lipídios encontrados para as duas amostras (ITA 1 e ITA 2) foram semelhantes 21 e 23% respectivamente.

De acordo com Hostim-Silva (2002), *G. genidens* foi a espécie mais abundante em um estudo da ictiofauna da foz do Rio Itajaí-açu sendo *C. spixii* considerada uma espécie pouco frequente. Os impactos dos BTs sobre a biota da região foi desenvolvido por Castro et al., (2012) em estudo envolvendo o gastrópode *S. haemastoma*. Nesse estudo, foi verificada a redução dos níveis de imposex no estuário. No entanto, níveis de BTs foram detectados nos tecidos desse organismo, com TBT variando entre 10,4 e 32,5 ng Sn g⁻¹. De acordo com os autores, a maior concentração de TBT encontrada em relação aos produtos de degradação pode ser resultante de uma entrada recente deste composto no ambiente assim como às menores taxas de metabolização desse organismo.

Ao verificarmos o BDI obtido para sedimentos obtidos no ponto ITA 2 (0,1) podemos indicar que a contaminação no estuário é recente, assim como através da elevada concentração de TBT no fígado dos pontos ITA1 e 2. Apesar da elevada concentração também dos produtos de degradação no fígado de *G. genidens* amostrados no ponto ITA 1 a presença do TBT nas amostras indica que este composto está biodisponível para a biota, proveniente de alguma das fontes pontuais identificadas nesse sistema tais como estaleiros, marinas ou mesmo atividades portuárias. Devido ao deslocamento dessa espécie envolvendo períodos reprodutivos (CORRÊA, 2001) esta pode migrar para o interior da Baía tendo, dessa forma, contato com matrizes abióticas ou organismos do nível inferior de sua cadeia trófica contaminados por BTs. O acúmulo de BTs via cadeia trófica é um processo importante uma vez que, em estudos onde são avaliados organismos de níveis tróficos superiores, estes apresentam concentrações muito acima daquelas descritas para o ambiente em seu entorno ou mesmo em organismos pertencentes à base dessa cadeia (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Com base nos resultados obtidos nesse estudo e na literatura, pode-se dizer que o estuário do Itajaí-Açu permanece sob o risco da entrada de TBT a partir do uso de tintas anti-incrustantes em embarcações, uma vez que é observada a presença desse contaminante em todas as matrizes ambientais. Embora o tempo de residência da água no estuário seja baixo (0,8 a 2,6 dias) devido à hidrodinâmica estuarina intensa, com velocidades de correntes elevadas (até 0,9m s⁻¹) em alguns pontos tais como o ITA 2, o TBT pode ser mensurado em elevadas concentrações o que indica uma entrada recente

proveniente possivelmente proveniente de marinas e estaleiros presentes na região. A partir das fontes pontuais, esses contaminantes estão sendo distribuídos ao longo do sistema estuarino e atingindo populações de diversos pontos do estuário e mesmo fora dele.

5.2. Baía da Babitonga- SC

Nas amostras de sedimentos superficiais referentes à Baía da Babitonga não foram detectados BTs em BAB 2 e BAB 3, enquanto na amostra BAB 1, assim como a amostra ITA 1 não foi possível a quantificação devido à presença de interferentes na amostra. Os sedimentos desse ponto, localizado nas proximidades da Vila da Glória, caracterizaram-se pela elevada concentração de matéria orgânica (14%) e pelo teor de enxofre considerado elevado (1,04%) o que os caracteriza como sedimentos de difícil quantificação em virtude dos interferentes discutidos no Capítulo II. Essa região é considerada área de pesca com a presença de uma colônia de pescadores existindo também a emissão de pontos de esgoto *in natura* (COSTA, 2011).

A presença de TBT nas amostras de MPS ($2,17 \text{ ng L}^{-1}$) assim como as amostras de fígado do bagre *A. luniscutis* ($77 \pm 29 \text{ ng g}^{-1}$) indicam a ocorrência de BTs nessa região. Oliveira et al. (2010) detectou concentrações de BTs em sedimentos provenientes dessa região em concentrações de 24,3 , 36,2 e 32,3 ng Sn g^{-1} , referindo-se à esse ponto como uma região de descarte de resíduos de dragagem. A amostragem referente a esse ponto foi realizada em condições de estofo de maré, em sizígia, com amplitude de 1,5m e a recente intrusão da cunha salina pode ter ocasionado a ressuspensão e transporte de sedimentos de fundo, carregando as partículas contendo BTs para essa área.

No ponto BAB 2, amostrado em maré vazante e localizado na região em frente ao Porto de São Francisco do Sul foi observado o mesmo padrão de distribuição dos BTs nos compartimentos estudados uma vez que foi detectado TBT no fígado de *C. spixii* ($66 \pm 13 \text{ ng g}^{-1}$) e no MPS ($4,5 \text{ ng L}^{-1}$) além do MBT (53 ng L^{-1}) também nesta última matriz. Nos sedimentos superficiais, apesar de localizado em uma região portuária, não foi detectada a presença de nenhum BT nessas amostras coletadas em 2010. Entretanto, no estudo desenvolvido por Oliveira et al (2010), foram detectadas concentrações desses compostos em sedimentos superficiais amostrados no cais do Porto em 2007. O autor aponta para uma contaminação antiga na região uma vez que as

concentrações dos produtos de degradação foram superiores (394 e 312 ng Sn g⁻¹ para DBT e MBT) às encontradas para o TBT (125 ng Sn g⁻¹) de acordo com o índice de degradação proposto por Díez et al., (2002). Sant'Anna (2011) em amostragem realizada em 2009 também detectou em um ponto próximo ao Porto de São Francisco do Sul uma concentração de 101±30 de DBT, sendo este o único BTs encontrado nessa amostra.

A assimilação de BTs pelos bagres *A. luniscutis* e *C. spixii*, amostrados nos pontos BAB1 e BAB2 corrobora o comportamento semelhante dessas duas espécies no ambiente, muitas vezes competindo pelos mesmos recursos alimentares (AZEVEDO et al., 1998) e a assimilação de contaminantes pode acontecer de maneira semelhante. Concentrações de BTs (TBT e DBT) também foram detectadas no fígado do bagre *G. genidens* do ponto BAB3 amostrado em uma região de maior salinidade (32psu). A amostragem dessa espécie em regiões de maiores salinidades também foi observada por Araújo, (1988) no estuário da Lagoa dos Patos. Este ponto está localizado na entrada do estuário, nas proximidades do Porto de Itapoá assim como de marinas da cidade. A concentração de MPS no local foi 114,22 mg L⁻¹ sendo que a composição dos sedimentos nessa área é predominantemente areia (97%) com características oxidantes (Eh⁻ de 56mV), fato que corrobora a presença apenas do MBT no MPS referente a esse ponto. A presença dos produtos de degradação nos tecidos do bagre estuarino, além da metabolização do organismo podem ser provenientes da assimilação desses compostos diretamente do sistema uma vez que as condições desse ambiente são favoráveis para a degradação do TBT. Como nesse ponto a amostragem foi realizada ainda em maré vazante, sedimentos em suspensão podem ter sido carregados a partir de regiões mais internas da baía tais como provenientes do Ponto BAB1 e 2 contendo BTs. Assim como mencionado par o ponto ITA 1, nesse ponto o acesso de *G. genidens* ao TBT (124 ng g⁻¹ no fígado) também pode ser proveniente de seu deslocamento ao longo da Baía.

O fracionamento de BTs no MPS da Baía da Babitonga apresentou um padrão específico com ausência do DBT em todas as amostras. A sorção máxima do DBT em partículas de sedimento é observada em pH=6 e menores salinidades (HOCH et al., 2003). Entretanto, as salinidades encontradas nos três pontos do estuário foram elevadas devido ao momento de maré, não sendo favoráveis para a sorção desse composto. Além disso, a maior sorção dos demais BTs em partículas de sedimento está diretamente relacionada à maior hidrofobicidade do TBT assim como maior polaridade do MBT (CELEUMANS e ADAMS, 1995). No ponto BAB3, a presença apenas de MBT no

MPS (53ng L^{-1}) pode dever-se à maior interação desse composto à fração inorgânica das partículas em suspensão (PINOCHET et al., 2009), sendo adsorvido através de interações eletrostáticas nessa matriz (RAMASWAMY et al., 2004; BURTON et al., 2004), uma vez que os sedimentos desse ponto são compostos principalmente por areia (97%) e um teor de carbono dentre os mais baixos (0,0087%).

Diferentemente de Itajaí, onde foi observada uma entrada recente de TBT no sistema estuarino, na Baía da Babitonga observa-se a ausência desse composto nos sedimentos amostrados embora ele esteja presente no MPS e biota. Este resultado pode ser consequência dos locais de amostragem, situados em regiões mais afastadas das fontes potenciais de entrada de TBT. De acordo com Felizzola (2005), a concentração deste composto em sedimentos superficiais é atribuída a regiões próximas às fontes de entrada sendo a concentração de MBT observada em regiões mais distantes. Esse comportamento pode ser observado no MPS uma vez que a concentração de MBT foi muito superior àquela encontrada para o TBT. A contaminação por TBT detectada no fígado dos peixes pode indicar que áreas contaminadas da Baía são utilizadas como locais de forrageio para as três espécies estudadas.

5.3. Baía de Guaratuba- PR

Na Baía de Guaratuba não foram detectados BTs em sedimentos superficiais, entretanto foi observada a presença desses contaminantes no MPS amostrados nos pontos GTB1 e GTB3 presentes no eixo principal de navegação. Na amostra de MPS GTB3 foram detectadas concentrações de 25, 8 e 137 ng L^{-1} de TBT, DBT e MBT respectivamente sendo este último analito também presente nas brânquias de *G. genidens* ($72\pm7\text{ ng g}^{-1}$). A presença de BTs nas brânquias é associada a entrada via passagem difusa de água, tal como observado por Viglino et al., (2006). Além disso, em maiores valores de pH, com as espécies dissolvidas desprovidas de carga, o fracionamento de BTs para a biota ocorre com maior facilidade (TSUDA et al., 1990). Nos demais pontos, o bagre amostrado foi o *C. spixii* e concentrações de BTs foram detectas no fígado, ponto GTB1. De acordo com Chaves et al. (2003) estas 2 espécies são bastante representativas na região e o padrão de distribuição encontrado condiz com o hábito dessas espécies, encontrando-se *G. genidens* em regiões mais rasas (5,5m) e *C. spixii* em locais de maiores profundidades (8 e 9m).

O ponto GTB1 está nas proximidades do Rio Boguaçu, que conta com efluentes da estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade além de receber ligações clandestinas que despejam esgoto *in natura* no canal (MIZERKOWSKI, 2007). De acordo com Pinel-Raffaitin et al. (2008), foram encontradas concentrações de BTs no material lixiviado de aterros sanitários, em elevadas concentrações (de 0,08 a 1,36 $\mu\text{g Sn L}^{-1}$) sendo que, segundo os autores, a eficiência do tratamento de esgoto irá determinar se essas concentrações chegarão aos sistemas aquáticos. Dessa forma, as concentrações de MBT detectadas do MPS dessa região podem também ser resultantes da entrada direta no sistema, sem a transformação do TBT presente em tintas anti-incrustantes.

O Ponto GTB 2 localiza-se em uma região mais afastada, em um dos canais da Baía cercados por manguezais e pertencente à APA de Guaratuba (PARANÁ, 2006a). Neste ponto não foram detectados BTs em nenhuma das matrizes em virtude de sua distância das fontes pontuais assim como menor influência de processos de transporte de contaminantes que ocorrem no eixo principal da Baía.

Sant'Anna (2011) quantificou BTs em tecidos do ermitão *Clibanarius vittatus* também na Baía de Guaratuba verificando a presença desses contaminantes. A amostragem não foi realizada nos mesmos pontos deste estudo, porém alguns resultados podem estar correlacionados uma vez que as maiores concentrações de TBT ($115 \pm 68 \text{ ng Sn g}^{-1}$) em tecidos do ermitão foi encontrada no ponto que também sofre a influência do rio Boguaçu.

Em regiões onde o tempo de residência da água é de muitos dias, o TBT costuma permanecer nas proximidades de sua fonte, não sendo transportado para outras regiões (LEE et al., 2006). No caso de Guaratuba, como mencionado anteriormente, este tempo de residência é de 9,3 dias (MARONE et al., 2004), sendo o maior dentre os estuários investigados.

Dessa forma, a partir dos resultados pode-se dizer que a Baía de Guaratuba apresenta indícios de contaminação por BTs embora de uma maneira mais sutil do que a encontrada nos dois estuários anteriores e as fontes desses compostos para o sistema podem incluir outras atividades humanas que não somente o uso de anti-incrustantes. Porém, como o ponto GTB3 localiza-se nas proximidades de uma cooperativa de pescadores acredita-se que possam haver embarcações que ainda utilizem essas tintas mesmo após o banimento das mesmas.

5.4. Baía de Paranaguá- PR

No CEP já foram realizados estudos da ocorrência de compostos organoestânicos em sedimentos superficiais, assim como avaliação da ocorrência de imposex em *Stramonita haemastoma* (SANTOS et al., 2009). Este estudo apontou para um impacto significativo destes contaminantes no sistema, atribuídos principalmente ao grande fluxo de pequenas e grandes embarcações na região, além de características ambientais favoráveis (correntes, composição e potencial de oxi-redução dos sedimentos) para a retenção e posterior dispersão destes compostos para o sistema estuarino e a biota associada.

Nesse estudo de 2009, as amostragens foram realizadas em um período anterior ao banimento das tintas à base de TBT, em 2006. Dessa forma, com os resultados obtidos neste estudo a partir da amostragem realizada em 2009, é possível uma comparação do grau de contaminação pós- banimento.

O ponto PNG1, localizado na porção inicial da Baía nos arredores da Ilha do Mel, apresentou concentrações de DBT e MBT nos sedimentos superficiais. Esses sedimentos são compostos em sua maioria por areia (70%) e, apesar dessa composição apresentou um teor mediano de MO (4,76%) e enxofre (0,58%). Em regiões como essa, a taxa de degradação pode ser considerada elevada uma vez que os compostos não adsorvidos podem estar mais expostos à agentes de degradação (SANTOS, 2008). Como já mencionado anteriormente, a degradação dos compostos butílicos de estanho em sedimentos pode ser resultante da influência de diversos fatores, dentre eles a radiação UV, potencial redox, matéria orgânica e composição dos sedimentos (HOCH, 2001) assim como bióticos tais como microrganismos (bactérias e algas) (ANTIZAR-LADISLAO, 2008) que podem estar presentes nessa matriz assim como adsorvidos no MPS.

Como já esperado, uma maior concentração de BTs ($\Sigma=586 \text{ ng g}^{-1}$) foi encontrada no ponto PNG3, localizado no Porto de Paranaguá. Essa elevada concentração ($279\pm33 \text{ ng g}^{-1}$) pode ser resultante também do elevado potencial redox (-198mV) observado nos sedimentos assim como pela maior profundidade (13m) dentre os três pontos amostrados (Tabela III.1), o que poderia favorecer a preservação do TBT nos sedimentos, com taxas mais lentas de degradação. Entretanto, como pode ser observado, foi detectada uma elevada concentração de MBT neste local, quase proporcional à concentração de TBT. Alguns autores relacionam a possível debutilação

do TBT formando diretamente o MBT sobre condições desconhecidas (MARCIC et al., 2006). Entretanto, acredita-se que a explicação mais coerente seja a maior adsorção de TBT e MBT resultante de seus comportamentos hidrofóbicos e polares, como já previamente discutido. Infelizmente para esse ponto, não temos informações a respeito da granulometria e análise elementar, dificultando a discussão a respeito da sorção associada à teores de sedimentos finos e matéria orgânica.

Em Paranaguá, Santos et al., (2009) encontrou uma concentração de 638 ng Sn g⁻¹ (1595 ng g⁻¹), no ponto mais próximo à localização do ponto 3 do presente estudo, onde foi detectada uma concentração de 279 ng g⁻¹. Esse valor inferior ao detectado antes do banimento de tintas à base deste composto indica uma rápida redução da contaminação apesar das características de preservação desse composto no local.

A concentração de TBT por *C. spixii* amostrado no ponto das proximidades do porto (PNG3) foi inferior àquela encontrada para o ponto PNG2 referente aos resultados encontrados no fígado desses organismos. Além do deslocamento dos peixes ao longo do estuário, esse fato pode estar relacionado à maior biodisponibilidade desse contaminante (LEE et al., 2006) no ponto PNG2, onde foi detectado no MPS e não no sedimento. O TBT presente no sedimento do ponto PNG3 pode estar mais fortemente associado às partículas de sedimento em decorrência de sua característica redutora e de maior profundidade como já mencionado, o que pode diminuir sua disponibilidade para a biota. Da mesma forma, em bagres amostrados no ponto PGN2 foi detectada a presença dos produtos de degradação cuja assimilação pode ser resultante da concentração desses compostos no MPS, com a maior concentração do MBT (89 ng L⁻¹) nessa matriz assim como nas brânquias (228 ng g⁻¹).

O material particulado em suspensão é uma matriz não comumente abordada no monitoramento de contaminantes do sistema estuarino. Entretanto, devido à sua capacidade de transporte ao longo da coluna d'água pode ser fundamental para a compreensão dos mecanismos de distribuição e biodisponibilidade de contaminantes no meio aquático. A concentração de material particulado obtida (54 a 62mg L⁻¹) é comum em regiões estuarinas nos meses de inverno, quando a influência de MPS fluvial é menor em decorrência de chuvas menos intensas (MACHADO, 2007).

Diferentemente dos sedimentos, o ponto PNG1 apresentou as maiores concentrações de TBT no MPS (54ng L⁻¹). Entretanto, as concentrações dos produtos de degradação nesse ponto foram muitos superiores. Os resultados obtidos foram inferiores àqueles encontrados por Santos et al. (2009) (10 a 700 ng Sn L⁻¹), quando o MPS foi

amostrado também na Baía de Paranaguá, porém em uma zona de máxima turbidez (ZMT), sendo a densidade de material particulado muito superior aos demais locais do estuário.

O trabalho de Castro et al. (2011) com *S. haemastoma* também foi desenvolvido nesse estuário, observando a redução da frequência de imposex entre 2006 e 2010 em fêmeas desse organismo. Em Santos et al., (2009) as regiões entre a entrada da baía e o meio no estuário apresentaram 100% de fêmeas imposexadas mesmo sendo regiões mais afastadas na região portuária. Entretanto, a movimentação de grandes embarcações rumo ao porto além de diversas embarcações menores que fazem o trajeto para a Ilha do Mel, além de embarcações de lazer e de praticagem podem também ser responsáveis pela entrada desse composto no ambiente (SANTOS, 2008).

Em fevereiro de 2009, o Canal da Galheta, localizado na entrada do estuário, entre a Ilha do Mel e o continente, recebeu uma dragagem emergencial para prover o aumento de seu calado (BRASIL, 2009- Gazeta do Povo) o que pode também ter contribuído para a dispersão de contaminantes no local assim como o aumento da biodisponibilidade dos mesmos para o sistema estuarino e marinho adjacente. Em 2011, após a amostragem, os berços do cais portuário também receberam essa dragagem emergencial fazendo com que as condições atuais de contaminação possam ser totalmente distintas das encontradas no presente trabalho. Essa discussão será retomada no Capítulo IV seção 5.2.

5.5. Cananéia- SP

Os sedimentos provenientes da amostragem de Cananéia apresentaram-se extremamente redutores em todos os pontos, possuindo inclusive profundidades semelhantes. Nos sedimentos superficiais amostrados foi detectado apenas o DBT referente ao ponto CAN1 em baixas concentrações ($19 \pm 8 \text{ ng g}^{-1}$). Neste ponto foi observado o maior valor de M.O (13%) assim como maior teor de enxofre (1,01%), sendo os sedimentos compostos por 25% de Argila. Esse foi o ponto amostrado com menor salinidade entre os três (28psu), coletado em estofo de maré. A presença apenas do DBT pode ser atribuída a maior sorção desse composto em regiões de menores salinidades (HOCH et al., 2003).

No MPS, foram detectados níveis de TBT e DBT semelhantes nos pontos CAN1 (7 e 5ng L⁻¹) e CAN3 (7 e 4ng L⁻¹) respectivamente. Já no ponto CAN2 foi detectada apenas a presença de TBT (6ng L⁻¹).

Os bagres estuarinos amostrados nesse estuário foram o *C. spixii* para os pontos 1 e 2 e *A. luniscutis* para os pontos 2 e 3. O ponto CAN2 que possui as duas espécies apresentou no fígado valores de DBT para *C.spixii* (455ng g⁻¹) e de TBT para *A. luniscutis* (57ng g⁻¹), naquela espécie também com valores de TBT para o ponto CAN3 (89ng g⁻¹).

Sant'Anna (2011) também encontrou concentrações de BTs em tecidos do ermitão *C. vittatus* em concentrações variando entre <LQ a 62ng Sn g⁻¹ para o TBT e DBT assim como em sedimentos de regiões intertidais (n.d. a 96ng Sn g⁻¹) para TBT, (n.d. a 77ng Sn g⁻¹) DBT e (n.d. a 2045ng Sn g⁻¹) MBT. Esta concentração elevada foi atribuída à presença de um estaleiro desativado na região de Iguape. Godoi et al. (2003b) encontrou baixos valores de BTs em sedimentos de Cananéia com valores de 17 a 53ng Sn g⁻¹ para o TBT e 14 a 18ng Sn g⁻¹ para o DBT, não detectando MBT nas suas amostras.

Através dos resultados obtidos verifica-se que existe uma fonte de entrada de TBT no sistema, decorrente da presença desses compostos no fígado de *A. luniscutis* amostrado nos pontos CAN2 e 3 assim como a presença desses compostos no MPS com o BDI inferior a 1. Acredita-se que as tintas possam ainda estar sendo utilizadas em pequenas embarcações da região, assim como o padrão observado na Baía de Guaratuba.

5.6. Santos- SP

Nas amostras de sedimentos superficiais de Santos foram detectados BTs nos três pontos amostrados. O ponto STO1, localizado na entrada do Porto de Santos e nas proximidades de um estaleiro⁷ foi detectado o TBT (26±4ng g⁻¹) e DBT (63±4ng g⁻¹). Os sedimentos dessa porção foram classificados como areia siltico argilosa apresentando o menor potencial redox (-279mV), maior profundidade (5,5m) e maior salinidade (31psu). Todas essas características juntas podem favorecer a preservação do TBT nos sedimentos além do fato deste ponto estar localizado nas proximidades de

⁷ Comunicação pessoal. Denis Moledo de Souza Abessa. Universidade Estadual Paulista. São Vicente-SP.

potenciais fontes de TBT, o Porto de Santos e receber grande movimento de pequenas embarcações. Os pontos STO2 e STO3 são mais próximos e localizam-se nas proximidades da Ilha Barnabé, ao norte do estuário. Nesses pontos foi observada apenas a presença dos produtos de degradação do TBT em sedimentos superficiais, porém, no MPS assim como para o ponto STO1 as concentrações desse analito foram bastante elevadas principalmente para o ponto STO2 (76 ng L^{-1}). No estudo conduzido por Sant'Anna (2011), as maiores concentrações de TBT ($285 \pm 11 \text{ ng Sn g}^{-1}$) em sedimentos superficiais foram detectadas na região portuária. Em regiões mais afastadas, o produto de degradação MBT foi predominante. Em um estudo anterior, conduzido por Godoi et al. (2003b), nas proximidades do Porto de Santos foram detectadas concentrações de TBT de até 482 ng Sn g^{-1} .

A espécie amostrada no estuário de Santos foi o *G. genidens* para os três pontos. As maiores concentrações foram detectadas no fígado de peixes provenientes do Ponto STO1 para o TBT ($102 \pm 10 \text{ ng g}^{-1}$), região de maior proximidade ao porto e no ponto STO2 para o DBT ($221 \pm 14 \text{ ng g}^{-1}$), amostrado na região interna da Baía. Para ermitões, Sant'Anna (2010) encontrou concentrações homogêneas de TBT e DBT nos três pontos amostrados ao longo do estuário em concentrações variando entre 9 e 59 ng Sn g^{-1} para o TBT e 18 a 71 ng Sn g^{-1} para o DBT.

De acordo com Tessler et al. (2006) na porção interna da Baía de Santos, os processos de transporte e deposição de sedimentos são influenciados pela interação entre a drenagem continental e marés. Os pontos STO2 e 3 estão situados entre o efluente do rio Cubatão e o canal principal do Porto de Santos podendo, dessa forma através dessa interação sofrer influência do MPS proveniente do Porto assim como de efluentes industriais que chegam na região. A presença somente de DBT em sedimentos desses pontos indica ou uma contaminação antiga ou, e muito provavelmente referente à entrada desses efluentes da região de Cubatão, grande polo industrial do Estado. A segunda hipótese é também mais coerente em virtude das condições redutoras presentes nos sedimentos dessa região que, caso apresentassem o TBT este estaria fortemente preservado.

Entretanto, a presença de TBT no MPS indica também o forte processo de transporte desses compostos através das partículas em suspensão, que podem ser provenientes da região portuária ou de marinas e estaleiros das proximidades principalmente decorrente da amostragem realizada em maré enchente, na sizígia. As atividades de dragagem realizadas na região nas proximidades do período de

amostragem podem também ser consideradas responsáveis pela distribuição dos BTs nesse sistema estuarino.

5.7. Baía de Sepetiba-RJ

Nos sedimentos superficiais foram detectados BTs apenas no ponto SEP1, porém somente o produto de degradação DBT ($338 \pm 14 \text{ ng g}^{-1}$), pois o MBT foi detectado em traços ficando abaixo do LQ (51 ng g^{-1}), mesmo padrão observado para os pontos STO 2 e 3 uma vez que o sedimento é extremamente redutor (-356 mV). Como mencionado anteriormente, a detecção de DBT nos sedimentos pode ser consequência da debutilação do TBT, porém também pode estar associada à sua entrada direta no ambiente através de efluentes industriais. De acordo com Hoch et al. (2003), a sorção máxima deste composto ocorre em $\text{pH}=6$ e menores salinidades, fato não observado para esse ponto.

Nas partículas em suspensão (MPS) foram encontrados níveis de todos os BTs em concentrações de 8, 25 e 16 ng g^{-1} respectivamente para TBT, DBT e MBT. No ponto SEP2, a amostra de MPS estava muito suja (densidade de MPS de 297 mg L^{-1}) inviabilizando a quantificação. Este fato pode estar relacionado ao elevado teor de M.O (17%) e enxofre (1,54%) nas amostras. Já no ponto SEP3, localizado na saída do Canal São Francisco (Rio Guandu), as concentrações no MPS foram as maiores do estuário com valores de 36, 9 e 175 ng L^{-1} para TBT, DBT e MBT. Este ponto apresentou uma densidade de MPS de 105 mg L^{-1} sendo as partículas de sedimento referentes a esse ponto classificadas como Argila (76%) com 17% de M.O. e 1,38% de enxofre (S). De acordo com Cunha et al., (2012) as velocidades residuais do Rio Guandu podem chegar a $0,16 \text{ m s}^{-1}$ devido à uma vazão de $187 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ sendo o maior responsável pela descarga fluvial da Baía (ZBOROWSKI, 2008). Nessa região, estão localizadas cerca de 10 grandes indústrias envolvendo produtos para indústria farmacêutica, catalisadores, pastas, detergentes, amaciantes, tintas especiais, isolantes térmicos e resinas acrílicas (ZBOROWSKI, 2008). Dentre essas empresas, os isolantes térmicos que trabalham com o processo de CVD (chemical vapour deposition), técnica que, muitas vezes utiliza MBT de acordo com Chae et al., (2004).

Para os peixes coletados na região, a espécie *G. genidens* foi amostrada nos pontos SEP1 e SEP3 enquanto *C. spixii* foi amostrada no ponto SEP2. No ponto SEP2, localizado nas proximidades do Porto de Itaguaí, foi detectado apenas o DBT no fígado

de *C. spixii*, na concentração de $58 \pm 10 \text{ ng g}^{-1}$. As maiores concentrações detectadas foram em peixes provenientes do ponto SEP 1, com 110 ± 27 e $18 \pm 17 \text{ ng g}^{-1}$ para TBT e DBT em amostras de fígado. Nesses peixes também foi detectado TBT nas brânquias ($81 \pm 26 \text{ ng g}^{-1}$) assim como os peixes da mesma espécie amostrados no ponto SEP3 ($58 \pm 8 \text{ ng g}^{-1}$). A grande taxa de sedimentação proveniente do Rio Guandu propicia uma maior turbidez da coluna d'água como pode ser observado através da maior concentração de MPS na região (61 a 297 mg L^{-1}). Essa turbidez é favorável para a permanência dos bagres nas proximidades desses pontos propiciando a assimilação dos BTs nessas regiões. Entretanto, apesar da concentração elevada de MBT no MPS, os peixes amostrados em Sepetiba não apresentaram esse composto em seus tecidos, provavelmente em decorrência de sua baixa capacidade de bioacumulação (KANNAN et al., 1995) ou mesmo em decorrência da rápida metabolização /degradação desses compostos.

Quadros et al., (2009) avaliaram a incidência de imposex em fêmeas de *S. haemastoma* da região de Sepetiba entre os anos de 2002 e 2004 porém os pontos amostrais não foram próximos aos do presente estudo uma vez que não encontrou esses organismos nas proximidades do Porto. Neste trabalho, é enfatizado o papel da circulação hidrodinâmica na dispersão dos BTs o que também pode ser observado no presente estudo pela concentração desses compostos detectada no MPS. Em regiões intertidais da Baía de Sepetiba, longe das fontes de entrada, Sant'Anna (2011) encontrou concentrações de 15 ng Sn g^{-1} de TBT o que pode também explicar a dispersão desses compostos na Baía.

5.8. Itapemirim-ES

Nas matrizes abióticas foram detectados TBT apenas no MPS referente aos pontos IPM1 e IPM2 em concentrações de 34 e 28 ng L^{-1} . A densidade de MPS no primeiro ponto foi extremamente elevada (441 mg L^{-1}), sendo o maior valor dentre todos os estuários amostrados. Apesar da elevada concentração de MPS, a quantificação de BTs foi possível devido ao baixo teor de M.O (0,94%) assim como enxofre (0,18). A composição de sedimentos na Barra do Rio Itapemirim foi basicamente Areia (mais de 96%) com porcentagens de enxofre apenas nos dois primeiros pontos de amostragem. Sabe-se que areias possuem poucos sítios de ligação para contaminantes, entretanto, devido à hidrofobicidade e baixa solubilidade do TBT este pode ser encontrado

adsorvido nesse material, porém mais biodisponível devido à fragilidade da interação com o substrato. Esse fato pode estar correlacionado aos teores de TBT encontrados no fígado dos peixes amostrados nesse estuário, sendo detectados níveis desse contaminante nos três pontos amostrados envolvendo as espécies *C. spixii* e *G. genidens*. A maior concentração de TBT nos organismos foi observada no ponto IPM1 ($80 \pm 14 \text{ ng g}^{-1}$) local onde normalmente se encontram os organismos em fase adulta.

A dificuldade de interpretação dos dados referentes a esse estuário deve-se a inexistência de estudos de contaminação assim como a escassez características morfológicas e hidrodinâmicas da região. Entretanto, assim como os demais estuários estudados, a região é importantíssima para a reprodução de bagres uma vez que Pinheiro et al., (2011) identificaram juvenis de *C. spixii* e *A. luniscutis* provenientes do delta do Itapemirim em Itaoca, região mais ao sul do Estado. A presença desses organismos em regiões como os pontos IPM2 e IPM3, de salinidade nula reforça essa hipótese sendo que os adultos amostrados nesses locais podem ter sido encontrados em virtude de seu ciclo reprodutivo.

5.9. Comportamento dos BTs nos compartimentos estuarinos investigados

Ecossistemas aquáticos caracterizam-se pela grande variação de fatores abióticos assim como no tempo de residência da água, influenciando a persistência, degradação ou acúmulo de contaminantes no ambiente e sua biodisponibilidade e efeitos sobre a biota (ALTENBURGER e SCHMITT-JANSEN, 2003).

Utilizando o índice de correlação de Spearman ($p < 0,05$) (Apêndice 6) a relação com a profundidade foi moderadamente significativa apenas para o TBT no fígado e para o MBT do MPS e fígado. A salinidade, por sua vez, mostrou-se significativa para a distribuição de todos os BTs presentes no MPS enquanto o pH também esteve moderadamente correlacionado com a distribuição de DBT nesta matriz.

A correlação fortemente positiva observada nas características dos sedimentos ($p > 0,7$) pode ser observada no Apêndice 7. Esses parâmetros tais como M.O, teor de enxofre, granulometria e E_h^- possuem grande importância no fracionamento dos BTs no ambiente estuarino. Acredita-se que em ambientes redutores (valores negativos de E_h^-), o enxofre possui uma influência bastante significativa no processo de imobilização de espécies metálicas (WASSERMAN e WASSERMAN, 2008) o que afeta a sua disponibilidade e mobilidade no ambiente.

Ao analisarmos o fracionamento dos BTs de uma maneira geral, dentre as matrizes, verificamos que existe uma correlação positiva e moderadamente significativa entre a concentração de TBT detectadas nos sedimentos em relação ao DBT (0,41) dessa mesma matriz, TBT no fígado (0,47) e nas brânquias (0,33). A relação com o DBT presente nos sedimentos é proveniente da debutilação do TBT, o que nos mostra que a presença desse composto nessas amostras ocorre também através desse processo no ambiente. A relação do TBT detectado no fígado e nas brânquias pode ser recorrente da assimilação desse composto diretamente da matriz, através de ingestão acidental pelo forrageio bentônico assim como suspensão de partículas de sedimento contendo esses compostos e que permanecem retidas nos tecidos branquiais. Além da concentração nos tecidos dos bagres, o TBT no sedimento esteve diretamente relacionado com outros parâmetros tais como silte, C, N e H presentes nessa matriz.

Para o DBT detectado no sedimento, seu comportamento ao longo dos estuários esteve relacionado ao MBT dessa matriz (debutilação) assim como o DBT presente no MPS (ressuspensão das partículas) e também com o conteúdo de TBT nos tecidos branquiais. O DBT assim como o TBT está associado aos parâmetros ambientais (ex. silte).

A associação de BTs à partículas finas (silte e argila) de sedimento é reportada por diversos autores (RAMASWAMY et al., 2004; RADKE et al., 2008). De acordo com Wasserman e Wasserman (2008), os sedimentos mais finos em suspensão possuem uma superfície altamente reativa, capaz de imobilizar e interagir com as superfícies de outras partículas e de substâncias dissolvidas em virtude de sua dupla camada eletroquímica que possibilita a sorção de compostos catiônicos. No presente estudo essa correlação foi de 0,39 e 0,35 para TBT e DBT respectivamente em relação ao conteúdo de silte. Já o teor de M.O. possui uma correlação mais fraca entre esses dois BTs com valores de 0,29 e 0,27 respectivamente contrariando diversos estudos onde essa correlação é elevada (BURTON et al., 2004; RAMASWAMY et al., 2004).

Também não foi observada correlação significativa entre os teores de argila e os BTs nos sedimentos e MPS. No entanto, a complexidade de materiais com diferentes composições mineralógicas e conteúdo orgânico que compõem os sedimentos podem influenciar de maneiras variáveis a sorção desses compostos (HOCH et al., 2004).

O produto de degradação MBT nos sedimentos esteve associado ao DBT no MPS (deposição de partículas em suspensão contendo DBT e que degradam à MBT nos sedimentos) e no fígado dos bagres (os bagres podem ter assimilado o DBT a partir do

MPS, pois existe uma correlação positiva entre o DBT no MPS e no fígado: 0,46) assim como o MBT presente nesse tecido (proveniente do MPS também, correlação positiva: 0,35).

Isso pode indicar que a presença de MBT no fígado de bagres estuarinos está relacionada com a sua assimilação através dos sedimentos e MPS assim como através do metabolismo, pois as concentrações de TBT e DBT no fígado também estiveram correlacionadas com o MBT nessa matriz (0,42 e 0,51 respectivamente). Além disso, esteve também correlacionada com a concentração de MPS presente na água de fundo (0,43)

Já a assimilação do DBT e concentração no fígado são provenientes do MPS contendo esse composto assimilado antes da deposição nos sedimentos, sendo o precursor também do MBT nesse tecido. O DBT possui maior solubilidade em água do que o TBT, sendo mais rapidamente liberado do sedimento (ROBERTS, 2012), o que amplia a sua distribuição no sistema aquático (HOCH et al., 2003).

A concentração de BTs no fígado não esteve relacionada com as brânquias. Como mencionado anteriormente, entretanto, o TBT nos tecidos branquiais apresentou relação positiva com o TBT e DBT presente nos sedimentos, sendo esse fator resultante da assimilação direta por forrageio.

A concentração de MPS na água de fundo também influenciou a detecção de MBT no MPS (0,55) e esteve fracamente correlacionada com a profundidade (0,31). Foi observada que quanto maior a concentração de MPS na água de fundo, menor é a concentração de DBT no sedimento. Isso porque, se a remobilização dos sedimentos está ocorrendo de forma intensa, gerando uma concentração maior de MPS na coluna d'água, o DBT, mais fracamente associado às partículas de sedimento tende a ser liberado para a fase aquosa e rapidamente degradado à MBT uma vez que ocorreu a correlação positiva em relação à concentração de MPS e o BT monossustituído.

No entanto, essa correlação do MBT com o MPS também pode estar associada a entrada desses composto diretamente no ambiente, tal como sugerido no ponto SEP3 devido à elevada concentração desse composto no MPS desse ponto. O MBT foi o BT predominante em Xiamen, China tanto no sedimento superficial quanto na fração dissolvida de água superficial e de fundo sendo atribuído a outras fontes além do uso de tintas anti-incrustantes (WANG et al., 2008). De acordo com o autor compostos monossustituídos de estanho costumam existir também dissolvidos na fase aquosa.

5.10. Assimilação de BTs entre as espécies estudadas

As concentrações máximas de BTs no fígado ao longo dos estuários investigados podem ser observadas na Figura III.13. Através dessa figura verifica-se que a presença do MBT ocorreu apenas no fígado dos peixes provenientes de estuários da região sul, onde a concentração deste composto no MPS é mais frequente. De uma forma geral, em peixes contendo DBT, este foi o BT mais representativo em 4 dos estuários (ITA, PNG, CAN e STO).

Figura III.13. Concentrações máximas (ng g^{-1}) de BTs detectadas no fígado dos bagres por estuário.

No entanto, ao analisarmos os estuários ponto a ponto, observa-se que a presença exclusivamente do TBT ou maiores porcentagens desse composto foram dominantes no fígado (Tabela III.4). Essa presença majoritária pode ocorrer devido à afinidade dos compostos trissubstituídos em ligar-se a aminoácidos, peptídeos e proteínas (DAVIES e SMITH, 1980) assim como da característica demersal desses organismos, estando em contato com o TBT que pode estar preservado em sedimentos de fundo. Em sedimentos estuarinos profundos a exposição à radiação UV é menos

intensa e, ao ocorrem condições mais redutoras nessa matriz, a taxa de degradação pode ser muito inferior àquela de sedimentos amostrados, por exemplo, em regiões de infralitoral, que recebem uma maior exposição desse agente de degradação (SANTOS et al., 2010).

Apesar de muitas vezes não encontrarmos TBT em sedimentos superficiais em onde foi detectado esse composto no fígado, a assimilação ocorre também através da dieta desses peixes e forrageio em regiões afastadas do local de captura. A assimilação via dieta é considerada como a principal via de entrada desses contaminantes em tecidos de peixes (MICHAUD e PELLETIER, 2006), sendo que em áreas contaminadas, o fígado pode conter uma maior concentração desse composto em decorrência de sua entrada constante no ambiente assim como a transferência para outros órgãos pode ocorrer de forma mais lenta (HARINO et al., 2002). De acordo com Chovanec et al. (2003), elevadas concentrações detectadas no fígado e brânquias podem ser resultantes de exposições recentes a contaminantes.

O TBT costuma acumular-se em tecidos com elevados teores lipídicos sendo os fatores de bioconcentração seguindo a ordem fígado > brânquias > músculo (BORGHI et al., 2002). Essa ordem é muitas vezes influenciada pela maior capacidade de acúmulo de contaminantes apolares em tecidos tais como fígado e brânquias que contém lipídios predominantemente neutros em sua composição (ELSKUS et al., 2005), sendo a forma neutra do TBT mais lipofílica (SHAWKY e EMONS, 1997). Nos pontos amostrais desse trabalho, a água de fundo apresentou valores de pH entre 7 e 8 sendo, dessa forma, propício para a incorporação de TBT por diferentes organismos. Além desses órgãos alvo em alguns estudos a elevada concentração de TBT em peixes (*Scophthalmus maximus*) também foi observada em testículos de machos, afetando assim a fecundidade desses organismos (GOSZ et al., 2011).

Experimentos conduzidos por Fent e Hunn (1993) apontaram uma assimilação rápida do TBT em larvas de peixes assim como uma baixa presença de DBT e MBT nesses organismos devido à ineficiência do metabolismo desse composto nessa fase inicial de desenvolvimento. Dessa forma, os riscos para organismos nessa fase são maiores do que os observados em indivíduos adultos, uma vez que o sistema metabólico P450 é capaz de transformar esse composto em seus produtos de degradação, desde que o sistema não seja inibido pelas elevadas concentrações de TBT. Diferenças de osmorregulação causadas pelo TBT também podem ser responsáveis pela diferente assimilação desse composto por organismos expostos (MEADOR et al., 1997). Estudos

de depuração envolvendo o peixe *Cyprinodon variegatus* alcançaram um tempo de meia vida de aproximadamente 7 dias (WARD et al., 1981).

Além desses fatores, a capacidade de assimilação dos BTs em peixes está correlacionada à capacidade de acumulação de cada espécie (LEE et al., 2006) assim como entre espécies de hábitos diferentes tais como bentônicas e pelágicas. De acordo com Lee et al., (2005), em peixes demersais o acúmulo de TBT foi maior em órgãos internos enquanto em peixes pelágicos a maior concentração foi detectada no músculo. Outro estudo aponta ainda para uma diferença de acumulação entre BTs e PhTs sendo os butílicos preferencialmente acumulados em organismos pelágicos, enquanto os fenílicos são majoritariamente detectados em organismos demersais (STAB et al., 1996).

As concentrações de BTs em tecidos de bagres estuarinos em diversos locais do mundo estão presentes na Tabela III.5. Como pode ser observado nesta tabela, as concentrações podem ser variáveis de acordo com a espécie, hábito assim como a exposição a fontes potenciais de entrada de TBT no sistema. Muitos estudos envolvendo essa matriz referem-se à amostragem antes do banimento dessas tintas, indicando que na época o impacto de BTs em peixes era elevado. Em estudos recentes, a quantificação é feita principalmente no músculo para que seja possível a análise de bioacumulação desses compostos através da dieta humana e avaliação de riscos à saúde. No entanto, como será discutido no capítulo IV, é no fígado que podemos observar os maiores efeitos desses contaminantes sobre a biota, alterando processos fisiológicos importantes para o desenvolvimento e reprodução das espécies.

Tabela III.5. Concentrações de BTs em tecidos de peixes amostrados em diversos países.

Continente/País	Ano	Espécie	Tecido	Concentrações ng g ⁻¹			Referência
				TBT	DBT	MBT	
Asia							
China, Bohai Bay	2002	<i>Chaeturichthys stigmatias</i> (demersal)	músculo	1,3	24,4	5,4	Hu et al. (2006)
India, Kavar Harbor	2007	<i>Synaptura pectoalis</i> (demersal)	n.i.	52	25	2	Jadhav et al. (2011)
Taiwan,Ilha Hsiao	n.i.	<i>Rachicentrum canadium</i> (pelágico)	fígado	751	39,8	68,6	Liu et al. (2011)
		<i>Rachicentrum canadium</i> (pelágico)	brânquias	169	n.d.	37,4	Liu et al. (2011)
Taiwan, Hsingta Harbor	2003	<i>Pagrus major</i> (demersal)	fígado	779	2635	4346	Lee et al. (2005)
		<i>Pagrus major</i> (demersal)	brânquias	424	208	655	Lee et al. (2005)
Taiwan, Wuchi Harbor	2001	<i>Liza macrolepis</i> (demersal)	orgãos internos	1817	n.a.	n.a.	Lee et al. (2006)
Japão, Kyushu	2008	<i>Paralichthys olivaceus</i> (demersal)	fígado	6,6	4,7	n.a.	Miki et al. (2011)
Europa							
Turquia, Aegean	2009	<i>Mullus barbatus</i> (demersal)	músculo	174	69,2	1496	Kucukcezgin et al. (2011)
UK, Thames estuary	1999	<i>Anguila anguila</i> (demersal)	fígado	143	26	66	Harino et al. (2002)
		<i>Anguila anguila</i> (demersal)	músculo	60	24	66	Harino et al. (2002)
Espanha, Mediterrâneo	1996	<i>Mora moro</i> (demersal)	fígado	130	134	88	Borghi et al.(2002)
		<i>Mora moro</i> (demersal)	brânquias	38	8,6	<1,6	Borghi et al.(2002)
Espanha, Mediterrâneo	1995	<i>Mullus barbatus</i> (demersal/marinho)	fígado	27	7	n.d	Morcillo et al. (1997)
Dinamarca, Costa	1998	<i>Platichthys flesus</i> (demersal marinho)	fígado	4,4 a 40	47 a 200	4,1 a 19	Strand e Jacobsen (2005)
América							
Canadá, Saguenay Fjord	99/02	<i>Licodes vahlii</i> (demersal)	fígado	n.d. a 115	n.d. a 102	n.d.	Viglino et al. (2006)
		<i>Licodes vahlii</i> (demersal)	brânquias	n.d. a 185	n.d. a 38	n.d. a 8	Viglino et al. (2006)
		<i>Sebastes fasciatus</i> (pelágica)	fígado	n.d. a 1822	n.d.	n.d.	Viglino et al. (2006)
		<i>Sebastes fasciatus</i> (pelágica)	brânquias	n.d. a 435	n.d. a 56	n.d.	Viglino et al. (2006)
Oceania							
Australia, Brisbane	1990	<i>Platycephalus fuscus</i> (demersal)	fígado	6,22	3,4	250	Kannan et al. (1995)
Australia, Brisbane	1990	<i>Platycephalus fuscus</i> (demersal)	músculo	2,0	3,1	24	Kannan et al. (1995)

Como previamente discutido na seção 5.9., de uma maneira geral, a assimilação de BTs neste estudo, esteve correlacionada ao ambiente em seu entorno, apresentando, dessa forma, variação entre as espécies estudadas relacionadas à exposição desses compostos. Na Tabela III.6 estão dispostas as concentrações médias de BTs obtidas para cada espécie. O Σ BTs no fígado assim como os analitos individuais detectados em *G. genidens* foram superiores aos valores encontrados *C. spixii* e *A. luniscutis*. Para o DBT em *C. spixii*, a maior contribuição (51%) é proveniente das amostras de PNG enquanto para *G. genidens* a maior contribuição (79%) é resultante principalmente do elevado valor obtido na amostra ITA 1.

Tabela III.6. Número de pontos amostrais (n) onde foram encontradas as espécies nos estuários investigados e concentrações médias de BTs obtidas entre elas. Resultados expressos em ng g^{-1} (w.w).

	n	TBT	DBT	MBT	Σ BTs
<i>A. luniscutis</i>	3	74	n.d	n.d	223
<i>C. spixii</i>	10	78	189	94	213
<i>G. genidens</i>	12	135	358	458	399

G. genidens costuma estar presente em águas mais rasas e mais salinas (Araújo, 1988), não competindo comumente por espaço e alimento com as outras duas espécies, uma vez que apenas os juvenis costumam ser encontrados no interior da baía ou adultos que se deslocaram para fins reprodutivos. De acordo com Lee et al., (2006) espécies que se deslocam por maiores distâncias tendem a acumular uma maior concentração de BTs do que as mais residentes, uma vez que estão expostas a diversas fontes de contaminação. O período de reprodução desta espécie costuma ser entre a primavera e verão (BARBIERI et al., 1991) e, em praticamente todos os estuários essa espécie foi amostrada em seu período reprodutivo, excetuando-se Itajaí (amostragem realizada no inverno) onde foram amostrados nos pontos 1 e 2 da Baía, localizados mais próximos à desembocadura do estuário (período não reprodutivo). Rabitto e Abilhôa (1999) ao investigar os hábitos alimentares desta espécie verificou a presença de sedimento em 100% das amostras analisadas atribuindo esse resultado à ingestão acidental ou mesmo intencional, para facilitar a trituração de organismos inteiros presentes em sua dieta, fato que também pode estar correlacionado com a maior assimilação de contaminantes tais como os BTs.

Como previamente mencionado, nem sempre a presença de TBT nas brânquias implicou na presença desse contaminante ou mesmo de qualquer BT no fígado, tal

como observado nas amostras GTB3 e SEP3. Nesses dois pontos, a concentração de BTs foi detectada no MPS, porém não nos sedimentos superficiais o que pode estar associado ao resultado obtido. De acordo com Roberts (2012) uma das formas mais comuns de adsorção desses contaminantes pode também ser através do MPS envolvendo a assimilação através da superfície branquial, por difusão, sendo que mesmo curtos períodos de exposição podem desencadear respostas subletais. De acordo com Lee (1996), a presença de TBT na água pode refletir um acúmulo desse contaminante nas brânquias, sendo 90% dos BTs associados ao TBT, e a ausência de metabólitos resultante da não influência deste tecido no metabolismo desse composto. Além disso, moléculas mais polares podem passar através das brânquias por difusão sem que ocorra o acúmulo nesses tecidos (CHOVANEK et al., 2003). Entretanto, de acordo com Shepard (1994), nas brânquias, a presença de contaminantes em elevadas concentrações pode ser uma resposta à exposição, estimulando a secreção de muco que pode agir como agente quelante, aumentando as concentrações desses compostos nesse tecido.

O acúmulo de BTs em peixes diádromos tais como os bagres estudados, pode ser influenciado principalmente pelo seu recente histórico de contaminação, a que foram expostos, diferentemente dos demais OTs tais como o trifenilestano (TPhT) que está mais diretamente relacionado à história de vida desses organismos. Isso ocorre devido ao maior potencial de bioacumulação reportado para compostos fenílicos de estanho (OHJI et al., 2006). Assim, o estudo da distribuição de BTs em peixes não está diretamente correlacionado ao seu tamanho e sexo, mas sim de acordo com a sua exposição (OHJI et al., 2011). A exposição, por sua vez pode ser mensurada através da porcentagem de TBT no fígado (OHJI et al., 2006). Como observado na Tabela III.4, dentre as amostras de tecidos, ITA2 (*G. genidens*), BAB1 (*C. spixii*) e 2 (*A. luniscutis*), CAN2 e 3 (*A. luniscutis*) e os peixes de Itapemirim (*C. spixii* e *G. genidens*) apresentaram 100% de TBT nas amostras de fígado assim como SEP 1 (*G. genidens*) apresentou 85%, valor considerado elevado.

Através da análise de exposição verifica-se que os três pontos amostrados contendo *A. luniscutis* estão entre aqueles com 100% de TBT no fígado, embora esta espécie tenha sido amostrada em regiões com elevadas concentrações de MBT (60 ng L^{-1}) no MPS tal como no ponto BAB 1. Como previamente observado, de um modo geral, a presença de MBT no fígado possui uma correlação positiva com a concentração de MBT no MPS, porém no caso deste ponto, essa associação não é verdadeira. Dessa

forma a assimilação de TBT por esta espécie pode estar relacionado ao seu comportamento no ambiente, estando em contato com esse contaminante em regiões de maior disponibilidade de TBT, que pode ser recente, ou estar fortemente preservado devido às condições redutoras dessas áreas. Assim, a característica desta espécie de estar associada a regiões mais profundas do estuário pode possibilitar a maior exposição a sedimentos redutores contendo TBT e ocasionando a assimilação desse composto. Assim como os resultados obtidos neste trabalho, onde o TBT foi o BT predominante nas brânquias, Viglino et al. (2006) encontrou o mesmo padrão utilizando *L.vahliei* ao longo do Fjord Saguenay, no Canadá assim como a maior concentração desse composto no seston amostrado em águas de fundo, sugerindo que a elevada adsorção e acumulação de TBT nessa matriz uma rota importante de contaminação (VIGLINO et al. 2006).

Apesar de *C. spixii* também estar relacionado a sedimentos mais profundos, a sua ocorrência em regiões intertidais também é reportada (POSSATO et al., 2011). Nessas regiões, como observado por Santos et al., (2010), ocorre o predomínio de produtos de degradação, principalmente o MBT em decorrência da maior exposição desses sedimentos a agentes de degradação tais como a incidência de radiação UV. Um desenho esquemático do comportamento dos BTs nos compartimentos ambientais investigados, resultantes das observações deste estudo assim como do conhecimento reportado na literatura pode ser observado na Figura III.14.

Mediante os resultados obtidos, considera-se que as três espécies são boas indicadoras da presença de BTs no ambiente estuarino devido à suas capacidades de assimilação destes compostos. Entretanto, em regiões onde o foco principal de contaminação ainda são os sedimentos sugere-se o monitoramento da espécie *G. genidens* e *A. luniscutis*, o primeiro devido à presença expressiva deste contaminante em brânquias e fígado, sendo para este tecido as maiores médias encontradas para todos os BTs, além de sua aparente maior mobilidade dentro do sistema estuarino o que lhe permite uma exposição a diversas fontes de contaminação e o segundo por ser um bom biomonitor da contaminação de TBT em sistemas estuarinos, demonstrando baixa metabolização desse composto ou assimilação diretamente de regiões mais profundas. Os efeitos das concentrações obtidas sobre a fisiologia e comportamento dos peixes serão discutidos no Capítulo IV.

Figura III.14. Distribuição dos BTs nos sistemas estuarinos analisados. Baseada nos resultados obtidos neste trabalho e em Hoch (2001).

5.11. Impacto dos BTs nos estuários investigados

O monitoramento de compostos butílicos de estanho vem sendo realizado por muitos anos a partir da amostragem de sedimentos superficiais, sendo este considerado como a forma mais precisa de avaliação de compostos hidrofóbicos no ambiente. Entretanto, sistemas estuarinos são dinâmicos e repletos de interações causadas por agentes naturais e antrópicos e que interferem na disposição e distribuição de contaminantes para o sistema.

Mesmo após o banimento das tintas a base de TBT, concentrações desse composto permanecem detectadas em uma infinidade de habitats em decorrência de sua persistência no ambiente assim como condições favoráveis de preservação. Como discutido no Capítulo I, embora grande parte dos países já possua uma legislação que proíba a comercialização dessas tintas a base de TBT, ainda não existem leis que proíbam a utilização desse composto em uma infinidade de aplicações comerciais assim como níveis permitidos em sedimentos. No Brasil, a ausência de legislação que determinem os valores máximos de TBT para sedimentos no CONAMA 344/04 faz com que não exista a avaliação desses compostos e dos riscos que eles podem causar ao meio ambiente em estudos de impacto ambiental de atividades de dragagem.

Assim, a classificação do nível de contaminação por TBT baseia-se em guias internacionais, um tanto defasados e incoerentes e que se referem às condições ambientais distintas das encontradas aqui no Brasil. Stronkhorst e Hattum (2003) compararam os valores máximos de TBT permitidos no SQG (Sediment Quality Guide) holandês para sedimentos dragados como de até 7 ng g^{-1} , assim como o IV (Intervention Value) alemão que menciona um aumento desses valores para até 6250 ng g^{-1} , uma considerável diferença. De acordo com Meador et al., (2002), concentrações de 120 ng g^{-1} de TBT no sedimento já são responsáveis por efeitos deletérios em organismos invertebrados bentônicos. De acordo com Perina et al. (2011), níveis tóxicos de TBT em *L. variegatus* expostos foram para NOEC, LOEC e IC50 respectivamente: 0,25 0,5 e $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$.

De acordo com o Guia Irlandês de Qualidade (CRONIN et al., 2006) para sedimentos dragados, as concentrações de TBT detectadas nos sedimentos superficiais de ITA2 (229 ng g^{-1}) e PNG3 (279 ng g^{-1}) encaixam-se na Classe II (entre 100 e 500 ng g^{-1}), como moderadamente contaminados. Sedimentos contendo acima de 500 ng g^{-1} de TBT podem, de acordo com o guia, ser classificados como altamente contaminados

além de serem considerados como nocivos à biota. Já a classificação desses sistemas estuarinos, de acordo com Waite et al. (1991), engloba essas concentrações como baixas, pois os valores encontram-se abaixo de 750 ng g^{-1} . Em decorrência das concentrações observadas nesses dois estuários, pode-se dizer que eles são os que ainda recebem um grande impacto causado pelo TBT, uma vez que a presença desse composto pode ser notada em matrizes bióticas e abióticas em elevadas concentrações. Estudos anteriores confirmam a presença de TBT nesses ambientes relacionando-os diretamente com a entrada via tintas anti-incrustantes (SANTOS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, elevadas concentrações de TBT no fígado desses organismos pode também indicar uma entrada recente desses compostos no ambiente devido à capacidade de metabolização ser comumente eficaz (SUDARYANTO et al., 2005). Entretanto, sabe-se que a metabolização do TBT em peixes, controlada pelo sistema citocromo P450 pode ser inibida na presença desse contaminante (IKEDA e YAMADA, 2003; OHJI et al., 2006).

As baixas concentrações de BTs detectadas em sedimentos superficiais amostrados neste estudo podem ser resultantes de diversos fatores tais como: a localização dos pontos, uma vez que, em muitos deles, os sedimentos amostrados não estavam localizados diretamente nas fontes pontuais de contaminação por esses compostos; como reflexo da redução de entrada de BTs após o banimento das tintas anti-incrustantes; da degradação desses compostos nessas matrizes em virtude dos processos hidrodinâmicos dos estuários, com ressuspensão constante de sedimentos superficiais devido à intensidade de maré ou provocados pela ação humana.

Como mencionado no Capítulo I, enquanto em alguns sistemas aquáticos tiveram o impacto causado pelo TBT lentamente reduzido (GARG et al., 2009; AIRAKSIEN et al., 2010), em outros locais foi observado um aumento da concentração desses compostos em sedimentos superficiais (FILIPKOWSKA et al., 2011; KIM et al., 2011) principalmente em países em desenvolvimento. Na Tabela III.7 estão presentes concentrações de BTs encontradas em diversos países, onde podem ser observados valores preocupantes mesmo após o banimento de tintas a base de TBT.

Tabela III.7. Concentrações de BTs encontradas em sedimentos superficiais em outros países.

Continente/País	Ano	Observações	Concentrações ng g ⁻¹ (d.w.)			Referência
			TBT	DBT	MBT	
<i>Asia</i>						
Korea, Ulsan	2003	Portos comerciais	^a -13430	^a -4734	^b	Choi (2009b)
China, Xiamen	2006	Portos comerciais	^a -65	^a -6,8	25-185	Wang et al. (2008)
Sudarban, India	2009	Atividades náuticas/Mangue	<LD a 84,2	<LD a 26,4	<LD a 48	Antizar-Ladislao et al.(2011)
Korea, Gohyeon Bay	2010	Portos e Marinas	1905	426	238	Kim et al. (2011)
<i>Europa</i>						
Espanha, Barcelona	95 a 03	Região Portuária	98-7673	67 -3519	5-1131	Díez and Bayona (2009)
Espanha, Golfo de Cádiz	2006	Portos pesqueiros	^a -1435	^a -878	^a -1285	Garg et al. (2009)
Portugal, Ria Formosa	2008	Marinas	1 a 165	0,2 a 112	1,3 a 714	Carvalho et al. (2009)
Polônia, Gdansk	2008	Região Portuária	<0,5 a 15780	0,9 a 2.060	<0,5 a 684	Filipkowska et al. (2011)
<i>América</i>						
Chile, Baía de San Vicente	2006	Atividades pesqueiras	35-3900	<40 -2340	<43 -758	Pinochet et al. (2009)
Argentina, Costa			^a -1369	^b	^b	Biggati et al. (2009)
Equador, Guayaquil	2009	Portos pesqueiros	32,5 a 247	3,6 a 116	70 a 548	Castro et al (2011)
<i>Oceania</i>						
Indonesia, Bitung	2004	Região Portuária	160 a 350	2 a 3	49-76	Harino et al., 2012
Australia, Queensland	2005	Marinas	n.d. a 8,5	n.d. a 6,5	n.d. a 4	Burton et al., 2004

No Brasil, estudos envolvendo a análise de OTs em sedimentos superficiais já foram desenvolvidos em estuários dos estados da BA, PR, RJ, SC e SP (GODOI et al., 2003b, FERNANDEZ et al., 2005; FELIZZOLA, 2008; SANTOS et al., 2009; SANTOS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; SANT'ANNA, 2011). Em pontos amostrais localizados nas imediações portuárias, os maiores valores encontrados para TBT foram de 2840 ng Sn g⁻¹ detectado no Porto de Itajaí-SC, em 2007 (OLIVEIRA et al., 2010), assim como o observado na Figura III.15 que compara os resultados máximos obtidos em todos esses estudos.

Além de Itajaí-SC (OLIVEIRA et al., 2010), elevadas concentrações de TBT após o banimento também foram observadas em Vitória-ES (MORAIS et al., 2010) com 2797ng g⁻¹. O estudos desenvolvido por Sant'Anna (2011), apesar de amostrados em 2009, pós banimento, referem-se a regiões intertidais enquanto os demais foram realizados em sedimentos superficiais de regiões mais profundas. Como pode ser observado nesses resultados, mesmo regiões desprovidas de grandes portos comerciais tais como: Camboriú em Santa Catarina; Cananéia, Guarujá e Ubatuba em São Paulo; e Paraty no Rio de Janeiro apresentaram concentrações significativas desses compostos em seus sedimentos indicando que os responsáveis pela entrada de BTs no ambiente não estão relacionadas diretamente com as grandes embarcações e sim às menores, tal como apontado por Santos et al. (2010).

Os resultados de BTs encontrados em nosso país são comparáveis com os demais países da América do Sul assim como os resultados presentes nos países asiáticos, em desenvolvimento. Entretanto, na maioria desses estudos não foi realizada uma correlação com as matrizes biológicas para a avaliação dos riscos incidentes sobre esses sistemas.

Embora a utilização de peixes como bioindicadores não possam responder a fatores de bioconcentração a partir dos sedimentos, a sua mobilidade permite a avaliação do estuário como um todo, uma vez que o forrageio acontece em diversas localidades, próximas ou não à “hot spots” de contaminação. Assim, a correlação entre os sedimentos e o conteúdo de BTs nos tecidos dos peixes não foi utilizada neste estudo. Porém, a correlação observada entre o conteúdo de BTs no fígado e a concentração desses compostos no MPS sugere que a assimilação possa também ser realizada através da ingestão de partículas em suspensão presentes na coluna d'água.

Figura III.15. Concentrações máximas de BTs encontradas em sedimentos superficiais no Brasil. Em asterisco: amostras analisadas neste trabalho.

Como mencionado no Capítulo I, a remobilização de sedimentos pode ser ocasionada por diversos motivos. As correntes de maré assim como tempestades podem ser fenômenos naturais de ressuspensão que contribuem significativamente para a dispersão dos poluentes presentes em sedimentos superficiais, principalmente àqueles compostos por materiais finos tais como siltes e argilas, principais componentes dos sedimentos aqui amostrados. De acordo com Radke et al. (2008) os fatores que mais influenciaram na distribuição espacial dos BTs em sedimentos foram a mistura mecânica causada pelo tráfego de embarcações e atividades de dragagem. Uma vez ressuspensos, esses sedimentos podem então ser transportados pela maré a outras localidades do estuário dependendo da fase (enchente ou vazante) e intensidade da maré (sizígia ou quadratura) (ROBERTS, 2012). Devido à esses processos de ressuspensão, muitas vezes, a concentração encontrada no MPS é superior àquela encontrada nos sedimentos superficiais (VIGLINO et al., 2006). Dafforn et al (2012) detectou concentrações de metais mais elevadas em sedimentos em suspensão do que em sedimentos superficiais em sítios menos contaminados sugerindo que o monitoramento de contaminantes apenas em sedimentos superficiais possa levar à uma subestimação dos riscos atribuídos aos organismos presentes na coluna d'água. Entretanto, esse parâmetro irá depender também de outros fatores, sendo que a concentração de BTs em sedimentos pode estar relacionada à intensidade de navegação assim como o tempo de residência da água no sistema (CIESIELSKI et al., 2004). Isso pode ser observado nos resultados obtidos nos estuários amostrados, uma vez que a concentração de BTs no MPS proveniente da água de fundo apresentou valores mais frequentes do que os encontrados no mesmo ponto em sedimentos superficiais.

Dentre todos os processos de ressuspensão de sedimentos estuarinos, as atividades de dragagem, executadas em regiões portuárias para aumentar o calado dos canais de navegação e berços é a mais impactante. Além da dragagem emergencial já discutida para o Porto de Paranaguá, em 2009, o Governo Federal aprovou o Programa Nacional de Dragagem (PND) dentro do Programa de Aceleração de Crescimento (PAC) visando obras de dragagem em diversos portos brasileiros. Dentre eles, destacam-se os portos de Itajaí e São Francisco do Sul (SC) e o de Santos (SP) presentes neste trabalho. O cronograma das obras na Babitonga envolveu 2 etapas sendo uma entre julho e setembro de 2010 e outra entre fevereiro e março de 2011 sendo retirados cerca de $4.327.686\text{m}^3$ (BRASIL, 2012d) de sedimentos da Baía com disposição ainda incerta.

De uma forma geral, as concentrações reduzidas de BTs em sedimentos superficiais podem estar relacionadas a fluxos difusores a partir dessa matriz e consequente passagem desses compostos para a coluna d'água (BURTON et al., 2004). Dessa forma, a importância do estudo do MPS no monitoramento dos BTs em sistemas estuarinos torna-se evidente. Cornelissen et al., (2008) detectou elevadas concentrações de TBT no Porto de Oslo em partículas provenientes do escoamento superficial indicando que a entrada desses compostos no ambiente não pode ser exclusivamente atribuída ao uso em tintas anti-incrustantes. Nesse estudo a presença de TBT também foi atribuída ao uso de estabilizadores de PVC, preservativos de madeira e tintas domésticas. Da mesma forma, também encontrou elevadas concentrações em partículas em suspensão com valores de BTs variando entre 58, 64 e 510 ng g⁻¹ para MBT, DBT e TBT respectivamente. No estudo de Bhosle et al., (2004) envolvendo OTs no MPS foram encontrados valores próximos aos do presente estudo, com concentrações que variaram entre 0,60 a 29 ng Sn L⁻¹, sendo o DBT foi o composto mais abundante nessas partículas em suspensão.

As concentrações encontradas na matriz particulada deste estudo são superiores (2,17 a 76ng L⁻¹) às detectadas no estudo de Bhosle et al. (2004) e podem ser consideradas preocupantes uma vez que muitos estudos tem demonstrado que peixes marinhos são sensíveis ao MPS contaminado de diversas maneiras. Dentre os estuários, o de Santos-SP apresentou os maiores valores de TBT em partículas em suspensão (25 a 76 ng L⁻¹) enquanto as maiores concentrações dos produtos de degradação foram detectadas em Paranaguá-PR: 25 a 106ng L⁻¹ para o DBT; e 89 a 166ng L⁻¹ para o MBT. Nos demais estuários, nas amostras em que a quantificação dos BTs no MPS foi possível, os valores ficaram acima de 3,6 ng L⁻¹, nível indicado como passível de toxicidade para os organismos (ZHANG et al., 2008).

Dessa forma, o estudo de diversas matrizes estuarinas pode fornecer o risco atrelado à exposição de BTs nesses sistemas assim como a distribuição e fracionamento desses compostos dependentes das características físicas de cada local. A partir das concentrações obtidas no MPS, sugere-se que o monitoramento desses compostos seja realizado também nessa matriz uma vez que o potencial de toxicidade de águas estuarinas pode ser determinado pelo balanço de vários processos físico-químicos que controlam a dinâmica dos contaminantes no meio (LANGSTON et al., 2009).

O uso de bagres estuarinos como bioindicadores da contaminação por BTs é recomendado em virtude de sua capacidade de assimilação através do ambiente ou pela

cadeia trófica. Seu deslocamento ao longo do estuário pode ser utilizado como uma ferramenta útil para a avaliação da contaminação difusa dentro de cada estuário, uma vez que a amostragem pontual pode mascarar as reais concentrações e presença desses compostos. O monitoramento realizado a partir da utilização desses peixes pode fornecer informações sobre a variação temporal e geográfica na concentração dos BTs acessando o ambiente como um todo, indicando a biodisponibilidade desses contaminantes para a biota estuarina. Assim, o estudo integrado das matrizes estuarinas pode auxiliar na detecção do nível de contaminação por BTs desses sistemas mesmo em locais onde as atividades humanas sejam menos impactantes tais como em Guaratuba-PR, Cananéia-SP e Itapemirim-ES.

6. Considerações do Capítulo III

A ocorrência dos BTs em diferentes matrizes ambientais pode fornecer uma importante ferramenta para a compreensão da possível fonte, comportamento e impactos ambientais desses compostos. Os sistemas estuarinos investigados apresentaram, em sua maioria, uma baixa concentração de BTs em sedimentos superficiais em decorrência de diversos fatores tais como distância do ponto de entrada assim como ressuspensão dessa matriz, uma vez que apresentou elevadas concentrações desses compostos no MPS. A exceção para sedimentos foram os estuários de Itajaí-SC e Paranaguá-PR onde a entrada de TBT no sistema permanece evidente.

Através dos resultados obtidos verifica-se que a assimilação desses contaminantes pelas espécies investigadas pode ocorrer através do ambiente, seja através do MPS, incorporação direta dos sedimentos através do forrageio, ou via cadeia alimentar, indicando a importância do estudo envolvendo as interações entre os compartimentos ambientais.

G. genidens apresentou uma maior concentração de BTs em seus tecidos, proveniente da proximidade de fontes de entrada ou mesmo deslocamento maior ao longo do estuário para reprodução e forrageio assim como a possível assimilação diretamente dos sedimentos. *A. luniscutis*, por sua vez, pode ser considerado como um bom biomonitor de TBT no sistema, uma vez que habita regiões mais profundas onde esse composto pode permanecer preservado em decorrência das condições mais redutoras. *C. spixii* apresentou uma concentração bastante elevada de BTs principalmente relacionada à Baía de Paranaguá-PR, sendo considerado também um bom biomonitor em virtude de sua ampla distribuição em ecossistemas estuarinos e capacidade de assimilação de contaminantes por diversas vias. A utilização de uma mesma guilda para a avaliação entre os estuários possibilitou a interpretação dos dados obtidos em diferentes sistemas estuarinos e o uso desses biomonitores permitiu a visualização da contaminação no estuário como um todo e não apenas nas proximidades de fontes pontuais.

**Capítulo IV – Uso de biomarcadores no fígado do bagre
Cathorops spixii amostrado na Baía de Paranaguá-PR**

1. Introdução

A utilização de peixes para estudos de monitoramento em sistemas aquáticos refere-se à sua ampla distribuição nesse sistema, sua grande importância como elo trófico e a sua capacidade de resposta a agentes externos ocorrer de forma semelhante às aquelas observadas em vertebrados superiores. No entanto, embora a quantificação de contaminantes nos tecidos desses organismos seja um excelente indicador da assimilação desses compostos a partir dos compartimentos ambientais, ela não reflete as consequências fisiológicas e ecológicas resultantes dessa exposição (CHOVANEK et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

Assim, respostas ecotoxicológicas de contaminantes em peixes não incluem, em sua maioria, implicações ambientais de sua exposição bem como as relações entre a concentração ambiental e a resposta desencadeada a partir da interação de fatores ambientais. Em estudos de biomonitoramento, uma adequada conjunção de respostas biológicas pode ser útil não apenas para determinar o risco para a saúde da biota, mas também para identificar o principal poluente responsável por tais efeitos (BARRA et al., 2001). Dessa forma, o uso de biomarcadores sensíveis à exposição a determinados agentes tóxicos em campo pode auxiliar na identificação precoce de riscos mais acentuados incidentes sobre um organismo, obtidos a partir de suas respostas bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (DEPLEGE et al., 1995).

Para a avaliação do impacto de BTs em sistemas aquáticos, o biomarcador mais utilizado refere-se ao imposex em moluscos, uma vez que essa alteração está diretamente relacionada à exposição ao TBT. Em decorrência dessa síndrome de alteração endócrina, a avaliação de enzimas que atuam sobre esse sistema torna-se útil, principalmente no que diz respeito à citocromo P450 aromatase, que é inibida na presença desse contaminante. Além desse biomarcador endócrino, a avaliação histopatológica do fígado também pode auxiliar na avaliação da exposição crônica e aguda a contaminantes orgânicos presentes no sistema estuarino assim como a avaliação genotóxica uma vez que é capaz de avaliar o risco atrelado a entrada de contaminantes na adaptação e perpetuação das espécies. Dessa forma, a quantificação de BTs no fígado aliada a utilização de biomarcadores de exposição e efeito em peixes pode auxiliar na avaliação do seu impacto sobre os sistemas estuarinos, mesmo após a redução do aporte desses contaminantes pelo uso de tintas anti-incrustantes, auxiliando na predição de riscos ambientais associados a esses contaminantes sobre o sistema.

2. Revisão de Literatura

O efeito toxicológico de contaminantes no sistema aquático engloba um conjunto de fatores que incluem a intensidade de exposição, fontes, interações entre os contaminantes assim como a sensibilidade dos organismos, assimilação, armazenamento, metabolização e excreção (CHOVANEK et al., 2003; HARTWELL e JORDAN, 2012). A sensibilidade de um organismo está atrelada às suas características morfológicas, fisiológicas e sua fase de desenvolvimento assim como a exposição depende do habitat, hábitos alimentares e dieta desses organismos juntamente com as características específicas do agente tóxico. Dentre as características dos contaminantes estão sua persistência, potencial de bioacumulação, metabólitos gerados e a sua distribuição/comportamento nos compartimentos ambientais (MARKERT et al., 2003; ALTENBURGER e SCHMITT-JANSEN, 2003).

Como mencionado no Capítulo I (Seção 7), a contaminação aquática por BTs tem sido de grande preocupação em diversos países devido à toxicidade do TBT especialmente para organismos mais sensíveis (PINOCHET et al., 2009). A persistência e a toxicidade dos BTs tornaram necessária a avaliação dos níveis de poluição em amostras de biota, particularmente em organismos que vivem em contato direto com o sedimento, considerado como depósito desses contaminantes hidrofóbicos no sistema (MORCILLO et al., 1997; GABBIANELLI et al., 2006).

O estresse permanente resultante da exposição à xenobióticos tais como o TBT, pode interferir em processos hormonais e bioquímicos levando a um aumento do metabolismo, imunossupressão, osmorregulação desregulada, falha na reprodução e danos aos tecidos de peixes (CHOVANEK et al., 2003). A toxicidade dos BTs para a biota aquática envolve diversos níveis de organização biológica mesmo em baixas concentrações (ng L^{-1}), sendo o TBT reportado como alterador endócrino em moluscos, responsável pelo surgimento de características masculinas em fêmeas, fenômeno conhecido como imposex (FERNANDEZ et al., 2005; LEUNG, 2006).

De acordo com Mortensen e Arukwe (2007), o mecanismo pelo qual o TBT induz a modulação do sistema endócrino não é bem compreendido embora muitos mecanismos tenham sido propostos. De acordo com Leung (2006), a masculinização ocorre devido a inibição da aromatase, enzima esteroindogênica crucial (LYSSIMACOU et al., 2006), responsável pela conversão do andrógenos a estrógenos

através do citocromo P450. Na Figura IV.1 está presente o desenho esquemático desse processo.

Figura VI.1. Biossíntese de hormônios esteróides e interferência do TBT no sistema. Adaptado de: Souza (2004).

Em peixes, também pode ser observado um efeito masculinizador devido à inibição da enzima P450 aromatase (CALLARD et al., 2001; McALLISTER e KIME, 2003; SHIMASAKI et al., 2003; LYSSIMACOU et al., 2006). De acordo com Shimazaki et al., (2003), linguados (*Paralichthys olivaceus*) expostos a concentração de $1\mu\text{g g}^{-1}$ de TBT através da dieta tiveram a masculinização induzida assim como o observado por McAllister e Kime (2003) para o peixe *Danio rerio* em concentrações de $0,1\text{ng L}^{-1}$. Peixes expostos ao TBT ($11,2\text{ ng L}^{-1}$) por 3 semanas reduziram a contagem de espermatozoides adultos de *Poecilia reticulata* em 40-75% (HAUBRUGE et al., 2000), efeito também observado por Gosz et al., (2011b), onde concentrações de 25 a 37 ng g^{-1} nos testículos foram suficientes para ocasionar a diminuição dos espermatozoides afetando a fisiologia reprodutiva, a saúde e o desenvolvimento das espécies expostas (TRANT et al., 1997; GRUN, 2006; GOSZ et al., 2011b).

Além dos efeitos reprodutivos, a exposição ao TBT afeta o comportamento sexual de espécies de peixes (MOCHIDA e FUJII, 2009). Nakayama e Oshima (2009) observaram uma redução do comportamento de perseguição, dança, “crossing” e

“malting” no Medaka Japonês (*Oryzias latipes*). Em concentrações acima de 10ng L^{-1} pode ser responsável também por efeitos neurotóxicos e de inibição da atividade Na^+/K^+ ATPase (ZHANG et al., 2008). Outros efeitos incluem ainda redução do timo, decréscimo do número de linfócitos e inibição do desenvolvimento gonadal (MORTENSEN e ARUKWE, 2007).

A concentração letal (CL_{50}) do TBT em peixes adultos determinada por Alzieu (1996), foi de cerca de $16\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ em 48 a 96hs, sendo que concentrações de $30\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ podem acarretar efeitos teratogênicos nesses organismos. De acordo com Brooke et al. (1986), sob exposição aguda (96hs) o CL_{50} para o bagre *Ictalurus punctatus* foi de $5,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ enquanto a crônica (32 dias) para o peixe *Pimephales promelas* foi de $2,2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ sendo que no tratamento com $0,08\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ já foi possível observar a redução de sobrevivência em 4%.

A toxicidade de xenobióticos tais como os BTs, pode ser investigada a partir da utilização de biomarcadores relacionados aos seus efeitos tóxicos, cujo principal órgão a ser investigado é o fígado, onde podem ser observadas elevadas concentrações desses compostos (CHOVANEK et al., 2003; RABITTO et al., 2005). O fígado dos peixes possui diferentes funções incluindo assimilação de nutrientes, produção de bile, detoxificação, manutenção da homeostase metabólica com o processamento de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas além de sintetizar proteínas plasmáticas tais como albumina e fibrinogênio (GENTEN et al., 2009).

Dessa forma, o monitoramento de xenobióticos associada a utilização de biomarcadores de efeito e exposição nesse órgão vital propiciam promissoras ferramentas para a avaliação do risco ambiental presente em um sistema, podendo ser utilizado de forma preditiva para avaliar a presença desses contaminantes em níveis analiticamente não detectáveis mas que podem afetar a biota aquática em decorrência de sua exposição crônica, bioacumulação, biomagnificação além do sinergismo entre contaminantes presentes no sistema (VAN der OOST et al., 2003; SILVA, 2010).

De acordo com Azevedo et al. (2009b) o uso de peixes como indicadores biológicos em programas de monitoramento de poluição é altamente recomendado porém não efetivamente utilizado. Como mencionado no capítulo anterior (seção 2.2), bagres são peixes úteis em estudos de monitoramento de contaminantes orgânicos, uma vez que estão em contato direto com o sedimento, reservatório principal desses compostos hidrofóbicos no ambiente aquático.

O bagre estuarino *Cathorops spixii*, vem sendo utilizado em diversos estudos de biomonitoramento, envolvendo estudo com metais (AZEVEDO et al., 2009; AZEVEDO et al., 2009b; KURIYOSHI, 2011) e poluentes orgânicos (KATSUMITI et al., 2008; MAGALHÃES, 2008), utilizando-se diferentes biomarcadores para a avaliação da saúde desses organismos em sistemas impactados.

Dessa forma, o uso de sentinelas adequados (biomonitores sensíveis) para o monitoramento ambiental de locais expostos a diferentes impactos pode ser considerada uma importante ferramenta para avaliar as respostas da saúde ambiental do sistema (BEN AMEUR et al., 2012).

2.1. Biomarcadores

Biomarcadores são parâmetros biológicos mensuráveis no nível suborganismo que consistem na observação de alterações nos processos celulares, bioquímicos estruturais ou funcionais resultantes da exposição a agentes externos, tais como contaminantes, seja na forma quanti ou qualitativa (MARKERT et al., 2003; VAN der OOST et al., 2003). Podem ser classificados como: de exposição (ou acumulação), que consiste na mensuração da substância em órgãos-alvo através de determinações analíticas ou bioquímicas; de efeito (ou impacto), com avaliações bioquímicas e fisiológicas; e de susceptibilidade, quando a exposição altera o funcionamento/expressão normal do organismo (NRC, 1987; WHO, 1999; MARKERT et al., 2003; RAMSDORF, 2011).

Em peixes, diversos biomarcadores são utilizados para determinar os efeitos subletais de contaminantes (KAWAI e NAKAYAMA, 2009). São úteis na obtenção de respostas precoces a respeito dos efeitos desses contaminantes no organismo, antes que o dano possa ser considerado irreversível (HANSEN, 2003). Para a análise do fígado, dentre os biomarcadores comumente utilizados estão os genéticos, bioquímicos e morfológicos (BEM AMEUR et al., 2012). Além desses marcadores, a dosagem de HPAs na bile também é utilizado como biomarcador, fornecendo informações a respeito da exposição recente uma vez que diminuem após algumas semanas sem que haja uma nova exposição (LEE e ANDERSON, 2005).

2.1.1. Genéticos

A grande incidência de BTs no ambiente vem causando consequências danosas à saúde dos sistemas aquáticos e sua biota levando a estudos envolvendo o dano ao DNA causado por esses contaminantes (GABBIANELLI et al., 2002). Acredita-se que a contaminação por xenobióticos, tais como os BTs, pode afetar o material genético de duas maneiras: exercendo uma pressão seletiva na estrutura da genética de populações, afetando a frequência gênica ou originando mudanças no DNA que podem levar a ocorrência de mutações (DIXON e WILSON, 2000).

Entretanto, vale ressaltar que, além dos xenobióticos, agentes físicos tais como radiação solar, raio-X, também são capazes de desencadear efeitos na estrutura genética das populações, influenciando a frequência gênica ou mesmo causando mudanças no DNA (DIXON e WILSON, 2000; LEE e STEINERT, 2003). Os testes comumente utilizados para avaliação da genotoxicidade em peixes são o teste do micronúcleo pisco e avaliação das alterações nucleares em eritrócitos, além do ensaio do cometa que pode ser aplicado em demais tecidos tais como o fígado.

O ensaio cometa, conhecido como SCGE (single cell gel electrophoresis), tem como objetivo verificar os danos causados ao DNA, seja na fita simples ou dupla, observada em células individuais que migram sobre um gel em uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988) a partir da exposição à agentes mutagênicos (RAMSDORF, 2011). É importante salientar que este teste não é utilizado para detectar mutações e sim para verificar as lesões cromossômicas que podem ou não desencadear uma mutação (GONTIJO e TICE, 2003).

Dentre as vantagens desta técnica estão incluídas: a avaliação do dano ao DNA em células individuais; um baixo número de células são necessárias para o ensaio; o ensaio pode ser realizado em qualquer célula eucariótica; é um método bastante sensível para a verificação do dano ao DNA (LEE e STEINERT, 2003). Entretanto, apesar de ser amplamente utilizado em estudos de monitoramento em peixes, indicando os impactos causados na integridade do dano ao DNA, reparo e recuperação (RAMSDORF, 2011) não é específico para um contaminante.

2.1.2. Bioquímicos

De acordo com Altenburger e Schmitt (2003), o conhecimento a respeito da ação e metabolismo de contaminantes auxilia na compreensão dos efeitos observados assim como verificar as concentrações desses compostos capazes de ocasionar esse efeito. Em peixes, o sistema metabólico P450 dependente é catalisado primeiramente pelo sistema monooxigenase (MFO-“mixed function oxygenases”), responsável pela transformação de compostos tóxicos apolares em substâncias mais polares, facilitando a excreção e eliminação pelo organismo (RAMSDORF, 2011).

O processo de biotransformação de xenobióticos pelo sistema MFO é composto por duas fases que trabalham sequencialmente: reações de Fase I, responsáveis pela hidrólise, oxidação e redução de contaminantes através da adição ou exposição de grupos funcionais; e reações de Fase II que consistem em reações sintéticas ou de conjugação (metilação), aumentando a solubilidade dos compostos (BUHLER e WILLIAMS, 1996; KAWAI e NAKAYAMA, 2009; KILEMADE et al., 2009). Pode ser considerado como um sistema acoplado de transporte de elétrons associado a matriz fosfolipídica do retículo endoplasmático de células, sendo um sistema enzimático composto por fosfolipídios, citocromo P450 e NADPH citocromo P450 redutase (BUHLER e WILLIAMS, 1998). Esse sistema é capaz de oxidar xenobióticos através de processos de desalquilação ou epoxidação, sendo responsável também pelo metabolismo de hormônios esteróides (CHOVANEC et al., 2003).

As enzimas do citocromo P450 (ou CYP450) são hemoproteínas pertencentes à Fase I (RAMSDORF, 2011), sendo componentes oxidase finais do sistema de transferência eletrônica localizado na fração microssomal da célula, responsável pelo metabolismo de muitos xenobióticos, sendo considerada um substrato componente ligante (ANDERSSON e FÖRLIN, 1992). O processo indutor/inibidor é basicamente o processo pelo qual um composto estimula/inibe a taxa de transcrição do gene, resultando em um aumento/diminuição nos níveis de RNAm e síntese da proteína P450. A resposta da indução/inibição ocorre através do receptor intracelular (Ah) envolvendo uma proteína heatshock (HSP90) e um fator de translocação nuclear seguido pela ativação/inibição dos genes (ANDERSSON e FÖRLIN, 1992).

Devido aos processos de metabolização/detoxificação, os contaminantes são eliminados pela bile, urina e fezes, porém podem ser reabsorvidos pelo intestino e retornam ao fígado através da circulação enterohepática, aumentando o tempo de meia

vida desses compostos em peixes (CHOVANEC et al., 2003). Metabólitos eletrofílicos podem também induzir efeitos citotóxicos, teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos através de reações com vários componentes celulares (BUHLER e WILLIAMS, 1998). Além do fígado, outros tecidos tais como os rins ou intestino também podem biotransformar xenobióticos (BUHLER e WILLIAMS, 1998).

A presença dos produtos de degradação do TBT no fígado está diretamente relacionada ao sistema MFO, onde o TBT é hidroxilado transformando-o em alfa, beta, gama e delta-hidroxidibutilestanho na Fase I, através da P450 aromatase. Na fase II reações conjugam açúcares ou sulfatos ao produto de degradação da fase I e esses conjugados altamente polares são rapidamente eliminados através da bile. No entanto, em embriões e juvenis, a presença desse composto pode ser responsável pela inibição do CYP450 hepático, inibindo a biotransformação desses compostos (FENT, 1998). Em adultos a resposta a elevadas concentrações de BTs irá depender da duração da exposição, exibindo uma toxicidade semelhante aquela observada para os juvenis (TANG e WANG, 2008).

Em peixes, a principal função do sistema metabólico de fase I (CYP450) é frequentemente mensurada através da atividade da EROD (ethoxiresorufina-*O*-deetilase) (LENNQUIST et al., 2008; SOLÉ et al., 2010), considerada como um marcador bioquímico de exposição a contaminantes. A inibição da atividade da EROD no fígado de peixes tem sido amplamente utilizada como biomarcador de exposição ao TBT “in vitro” sendo bem estabelecida para estudos da MFO e processos de biotransformação (BARRA et al., 2001; HANSEN, 2003). A EROD tem como substrato a 7-etoxiresorufina e através da *o*-desalquilação ocorre a formação de resorufina que pode ser mensurada por espectrofluorometria (RAMSDORF, 2011). De acordo com Kawai e Nakayama (2009) a dosagem da atividade da EROD é mais sensível ao TBT do que a quantificação do conteúdo de P450.

A glutathione-*S*-transferase (GST) é a enzima associada a fase II do processo de biotransformação, responsável pela conjugação de compostos eletrofílicos provenientes da fase I com a glutathione reduzida (GSH) sendo também importante no processo de detoxificação de xenobióticos (SILVA, 2007). Pode ser considerada uma importante enzima de defesa celular contra ambientes oxidantes, auxiliando os organismos na adaptação a novas condições de exposição (OLIVEIRA et al., 2010).

Durante o processo de biotransformação ocorre a geração excessiva do íon superóxido que é dismutado formando o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e, em caso de

deficiência do sistema antioxidante pode ocorrer o estresse oxidativo (WANG et al., 2005; SILVA, 2007; COLLINS, 2009), representados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (CLEMENTE, 2009).

Quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante podem ocorrer danos cruciais nos componentes celulares (OLIVEIRA et al., 2010). As principais consequências do estresse oxidativo são a lipoperoxidação da membrana celular, a oxidação de proteínas e as lesões ao DNA e RNA celular (SILVA, 2007). A lipoperoxidação (LPO) é um dos danos mais importantes ocasionados pelo EROs e ocorre através de uma sequência de reações tendo como consequência a perturbação das funções essenciais celulares e organelas com a formação de hiperóxidos (GUILOSKI, 2009; SILVA, 2007) que podem aumentar a partir da exposição a contaminantes (FONSECA et al., 2011). Através da perda da integridade da membrana celular ocorre o aumento da permeabilidade tornando o ambiente favorável ao ataque ao DNA (HIGUCHI, 2004).

Dessa forma, a avaliação da LPO e o dano genético são importantes no monitoramento de contaminantes (OLIVEIRA et al., 2010), tais como os BTs. Na Figura IV.2 está presente o desenho esquemático da exposição e biotransformação do TBT em peixes, indicando os biomarcadores abordados até o momento.

Figura IV.2. Biotransformação do TBT em peixes. Adaptado de Hansen (2003).

2.1.3. Morfológicos

Danos morfológicos em órgãos específicos expressam as condições de saúde e impactos endógenos e exógenos nos organismos (RABITTO et al., 2005) sendo as respostas histológicas ferramentas úteis na avaliação do grau de contaminação particularmente para efeitos subletais e crônicos (BERNET et al., 1999; BEN AMOUR et al., 2012), associados a poluição aquática local (SILVA, 2010).

O fígado, por ser considerado um importante órgão-alvo para a avaliação da exposição a contaminantes (ALVES COSTA et al., 2007) e comumente o foco principal de biomarcadores histopatológicos (DABROWSKA et al., 2012). As lesões comumente encontradas nesse tecido envolvem respostas inflamatórias, necroses e fibroses (CHOVANEC et al., 2003). Algumas das características do tecido impactado envolvem a redução do número de glóbulos vermelhos, aumento do peso e hiperplasia de células do fígado. Além disso, a presença de células mortas pode estar relacionada à ausência de resposta imune (SILVA, 2010). Devido à sua ampla funcionalidade, deteriorações na estrutura do fígado podem afetar a homeostase e levar a morte do organismo (SILVA, 2010).

Modificações estruturais refletem o impacto gradual do metabolismo, variando entre respostas adaptativas e degenerativas (CHOVANEC et al., 2003). No entanto, muitas vezes as alterações histopatológicas podem ser ocasionadas pela presença de parasitas, vírus e bactérias e não apenas pela ocorrência de contaminantes (CHOVANEC et al., 2003). Através da análise histopatológica é possível observar a capacidade de resposta do sistema imune a agentes externos em decorrência da presença de melanomacrófagos livres (ML) que podem também ser encontrados na forma de grandes centros (CMM). Essas estruturas podem se desenvolver a partir de lesões inflamatórias crônicas (AGIUS e ROBERTS, 2003) agindo como englobadores e depositores de moléculas, partículas e fragmentos estranhos presentes no compartimento celular (DABROWSKA et al., 2012).

Embora os dados histopatológicos, obtidos a partir do monitoramento de peixes no ambiente seja importante, certas vezes, esses dados sozinhos podem não ser suficientes para a realização de um diagnóstico ambiental preciso sendo necessárias também análises bioquímicas ou uso de outros biomarcadores associados (RABITTO et al., 2005).

2.1.4. Dosagem de HPAs na Bile

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes orgânicos apolares, hidrofóbicos e persistentes amplamente distribuídos no ambiente marinho e que possuem 2 ou mais anéis aromáticos condensados (Figura IV.3) (KIME et al., 1998; PATIRE, 2010). Sua entrada no ambiente está atrelada a fontes naturais e antropogênicas, através da queima incompleta de combustíveis fósseis, escoamento superficial, atividades de navegação, derramamento de petróleo, efluentes industriais e deposição atmosférica (KIME, 1998; MACENO, 2010).

Figura IV.3. Estrutura dos 16 HPAs prioritários determinados pela USEPA. Fonte: Stefens, 2006.

Metabólitos de HPAs são depositados na bile após passar pelo processo de biotransformação do sistema MOF onde são oxidados na fase I (introdução de um grupo polar na molécula através de processos oxidativos, redutores ou hidrolíticos) e conjugados na fase II (com constituintes polares tais como ácido glucurônico, sulfato, glutathione e aminoácidos) (TUVIKENE, 1995; ALBERGARIA-BARBOSA, 2009). Podem se associar a substratos hidrossolúveis dos organismos como o DNA e RNA (TUVIKENE, 1995; ALBERGARIA-BARBOSA, 2009). De acordo com Pait e Nelson (2002), são um dos contaminantes orgânicos responsáveis pela indução do citocromo P450, sendo sua dosagem na bile de peixes um método alternativo e complementar

para monitorar a exposição a esses contaminantes assim como a biodisponibilidade para esses organismos (BARRA et al., 2001; PATIRE, 2010). À medida que esses metabólitos são formados aumenta a biodisponibilidade (distribuição entre diferentes tecidos) e toxicidade dos HPAs para esses organismos, pois possuem uma similaridade estrutural aos estrógenos (KIME et al., 1998).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Correlacionar as concentrações de BTs no fígado de *C. spixii* amostrados em Paranaguá-PR e as respostas biológicas obtidas através do uso de biomarcadores.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar os BTs (TBT, DBT e MBT) no fígado do bagre estuarino *C. spixii* amostrado em 2 pontos da Baía de Paranaguá-PR em regiões consideradas de maior e menor impacto por BTs;

- Utilizar biomarcadores morfológicos (fator de condição, índices de lesões e contagem de centros de melanomacrófagos), genéticos (ensaio cometa de fígado) e bioquímicos (atividade enzimática da EROD, GST e LPO) além do uso da dosagem de HPAs na bile também como biomarcador, para verificar a saúde desta espécie nesse sistema estuarino.

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostragem

A amostragem do bagre *C. spixii* foi realizada em Julho de 2011 utilizando como método de coleta o arrasto de porta por 10 minutos em dois locais distintos: um no Porto de Paranaguá (A) (S25°30'20" W48°32'31"), região mais impactada por BTs em decorrência da presença do Porto além de efluentes industriais e urbanos; e outro nas proximidades da Ponta do Poço (B) (S25°33'21" W48°25'10") e Ilha da Cotinga, em Pontal do Sul (Figura IV.4).

Figura IV.4. Pontos de amostragem de *C.spixii* para a análise de toxicidade na Baía de Paranaguá, PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.

Foram amostrados 20 exemplares de cada ponto, mantidos vivos em isopores contendo aeradores. Na base de pesquisa, os organismos foram anestesiados com 10mL de solução de benzocaína 10% para cada litro de água. Em seguida foram mensurados o comprimento total (CT) e parcial (CP), peso (g) e sexo de cada indivíduo. Na Tabela IV.1 estão presentes os dados biométricos dos exemplares amostrados.

Tabela IV.1. Dados biométricos dos exemplares de *C. spixii* amostrados na Baía de Paranaguá-PR.

Amostra	CP	CT	Peso	Sexo	Amostra	CP	CT	Peso	Sexo
A1	17	20	57	♀	B1	15	17	44	♀
A2	17	21	61	♀	B2	19	22	82	♂
A3	16	19	53	♀	B3	16	19	56	♀
A4	16	18	44	♀	B4	12	14	23	♂
A5	15	19	34	♀	B5	19	22	107	♂
A6	16	19	68	♀	B6	20	24	104	♀
A7	17	20	61	♂	B7	16	19	53	♂
A8	17	21	83	♀	B8	16	20	61	♀
A9	14	16	36	♀	B9	19	22	85	♂
A10	16	19	41	♂	B10	22	25	200	♂
A11	14	16	39	♀	B11	16	18	45	♂
A12	14	16	34	♂	B12	19	23	96	♂
A13	14	16	36	♀	B13	19	22	79	♂
A14	15	18	43	♀	B14	18	22	83	♀
A15	15	15	27	♂	B15	17	20	55	♂
A16	13	16	30	♂	B16	18	21	70	♂
A17	13	16	30	♂	B17	19	22	102	♂
A18	14	16	31	♀	B18	20	24	93	♀
A19	11	13	14	♀	B19	15	17	43	♂
A20	12	14	22	♂	B20	14	17	36	♂
Min	11	13	14	-	Min	12	14	23	-
Max	17	21	83	-	Max	22	25	200	-
Média	14±2	17±2	42±16	-	Média	17±2	20±3	76±38	-

Após a biometria, foram adotados os procedimentos necessários para cada análise: dissecação do fígado para a realização dos ensaios bioquímicos, genéticos e morfológicos assim como quantificação dos BTs neste tecido; retirada da bile para a dosagem de HPAs. Dependendo da necessidade de cada teste o material foi rapidamente congelado em N₂ líquido ou fixado para transporte até os laboratórios da UFPR em Curitiba.

4.2. Quantificação dos BTs

A quantificação dos BTs no fígado do bagre *C. spixii* foi realizada na Unesp-Araraquara e seguiu a metodologia descrita no Capítulo II. Entretanto, foi realizado um “pool” de dois indivíduos para que fosse possível a obtenção de 0,5g de amostra. As amostras estão identificadas na Tabela IV.2.

Tabela IV.2. “Pool” das amostras de fígado de *C. spixii* identificadas para a análise de BTs: (A)Porto de Paranaguá; (B)-Ponta do Poço.

Amostra	Indivíduos (A)	Amostra	Indivíduos (B)
A1	1 e 7	B1	1 e 2
A2	3 e 4	B2	3 e 4
A3	5 e 6	B3	5 e 6
A4	8	B4	7 e 8
A5	9 e 10	B5	9 e 10
A6	11 e 12	B6	11 e 12
A7	13 e 14	B7	13 e 14
A8	15 e 16	B8	15 e 16
A9	17 e 18	B9	17 e 18
A10	19 e 20	B10	19 e 20

Devido à quantidade reduzida de amostra de fígado, a quantificação dos BTs foi realizada apenas uma (1) vez, compondo, dessa maneira, uma réplica analítica e três de injeção.

4.3. Genotoxicidade

O ensaio cometa foi realizado em hepatócitos segundo Speit e Hartmann (1999) com modificações de Ferraro et al. (2004) e realizado no Departamento de Genética da UFPR em Curitiba, através da colaboração com a profa. Marta Margerete Cestari. Os danos genéticos em hepatócitos estão relacionados ao potencial genotóxico crônico. Primeiramente 10µL do homogeneizado de hepatócitos preservados em soro bovino fetal foram diluídos em 120µL de agarose de baixo ponto de fusão e plotados sobre uma lâmina coberta com agarose ultra-pura. As lâminas foram colocadas em uma solução de lise composta de NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH

(0,8%), N-lauril-sarcocinato (1%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por 72 h a 4°C. Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10N) e EDTA (200 mM), pH>13 por 25 minutos, para desnaturar o DNA. Então foi realizada a eletroforese a 300mA e 25 V por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas em 0,4M Tris, pH 7,5 e fixadas em etanol por 10 minutos. Os cometas foram corados com 0,02 g/mL de brometo de etídeo e contabilizados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Foram analisados visualmente 100 cometas por lâmina e contabilizados de acordo com Collins et al (1997) em cinco classes de danos: partindo do dano 0 (núcleo condensado, sem dano), 1 (pouco dano), 2 (dano médio), 3 (grande número de danos) e 4 (dano máximo). O escore foi obtido a partir da incidência de danos pelos valores a eles atribuídos.

4.4. Enzimas

A dosagem de enzimas foi realizada no Departamento de Farmacologia da UFPR em Curitiba, sob a supervisão da profa. Helena Silva de Assis. Na dosagem da atividade enzimática de EROD, GST e LPO foi utilizada a mesma combinação de “pool” de indivíduos realizada para a quantificação dos BTs nos tecidos, segundo a metodologia utilizada por Guiloski (2009). Para EROD e GST as amostras foram homogenizadas (homogenizador Potter Elvehjem) com tampão fosfato 0,1M pH7,4, centrifugadas por 20 minutos a 4°C, retirando-se o sobrenadante em seguida. Para a LPO a homogenização foi realizada na proporção 1:10 de metanol.

Para a análise da atividade enzimática da EROD, em microplacas, a amostra é aliquotada e adiciona-se a solução de 7 ER 2,6 μ M (preparada em tampão pH7,5) seguida de incubação a 27°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 30 μ L de NADPH 2,6 mM iniciando a reação que foi lida em espectrofotômetro (TECAN A-5082) no comprimento de onda 530/590 durante 15 minutos. A atividade da EROD foi então calculada através da curva de calibração e corrigida pelo teor de proteínas dosadas na amostra pelo método de Bradford (1976). Dessa forma, os resultados finais foram expressos em pmol min⁻¹. mgproteína⁻¹.

As amostras diluídas para GST foram pipetadas (100 μ L) em microplaca adicionando-se em seguida 200 μ L de solução de reação: CDNB (2,5mM), GSH (2,0mM) e tampão fosfato. A conjugação do substrato CDNB com GSH é catalisada

pela GST que pode ser observada a partir do aumento da absorbância mensurada em 340nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mgproteína}^{-1}$.

A liporeroxidação é dada indiretamente pela concentração de hiperóxido, verificada a partir do método de FOX (Ferrous Oxidation/Xylenol Orange Method) (JIANG et al., 1992). O sobrenadante foi diluído na proporção 1:5 em metanol 30%, levado ao ultrassom por 2 minutos e centrifugado por 10 minutos a 4°C. As amostras (30 μL) foram pipetadas em microplaca adicionado-se em seguida 270 μL de solução de reação (laranja de xilenol a 100 μM , H_2SO_4 a 25mM, BHT-hidroxitolueno butilado a 4mM, FeSO_4NH_4 a 250 μM) e incubadas por 30 minutos antes da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram expressos em $\text{mmol.min}^{-1}.\text{mgproteína}^{-1}$.

4.5. Histopatologia

As análises histopatológicas foram realizadas no Departamento de Biologia Celular da UFPR, em Curitiba, sob a supervisão do prof. Ciro de Oliveira Ribeiro. A metodologia para análise histopatológica do fígado de *C. spixii* seguiu a metodologia descrita por Rabitto et al., (2005). As amostras de fígado preservadas em Alfac (85mL de etanol 80%, 10mL d formol e 5 mL de ácido acético glacial) durante 16 horas. Em seguida, foram estocadas em etanol 70% e mantidas sobre refrigeração até a próxima etapa de preparo do material. Os tecidos foram então desidratados em uma série gradativa de diferentes concentrações de etanol (70 a 100%), diafanizados em xilol para posterior emblocagem em Paraplast (Sigma©). Secções de 5 μm obtidas em micrótomo (Leica RM 2145) foram então coradas com hematoxilina/eosina e analisadas em microscópio óptico (Zeiss).

Para a avaliação das lesões no fígado foi utilizado o índice de lesões estabelecido por Bernet et al. (1999) com valores atribuídos aos seguintes fatores de importância: 2 para resposta inflamatória; 3 para necrose e para neoplasia maligna. O índice (I_{org}) é então calculado a partir da soma do escore de lesão (0 a 6) pelo valor a ela atribuído. A contagem de centro de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML) foi realizada de acordo com Rabitto et al. (2005), sendo a contagem efetuada em 15 campos da lâmina contendo o tecido e o total expresso em mm^2 .

4.6. Fator de condição

Para a avaliação da relação comprimento/peso dos peixes amostrados foi utilizado o fator alométrico de condição (CF) que consiste primeiramente na obtenção de uma regressão linear entre os valores de massa (g) e comprimento total (cm), seguida pela aplicação da fórmula: $CF = M \times CT^b$; onde b corresponde ao coeficiente angular obtido na curva de regressão (SILVA, 2010).

4.7. Dosagem de HPAs em Bile

A dosagem de HPAs foi realizada sob a supervisão do prof. Ciro de Oliveira Ribeiro, realizadas no Departamento de Biologia Celular da UFPR em Curitiba. A metodologia de dosagem de HPAs na bile seguiu o método descrito por Silva (2010). Os HPAs e seus metabólitos são fluorescentes permitindo a sua quantificação através de espectrofluorimetria, método relativamente simples uma vez que não necessita da separação cromatográfica dos compostos (BARRA et al., 2001; SILVA, 2010).

A quantificação de metabólitos de HPA na bile dos peixes amostrados foi possível em 6 amostras do ponto A e em 5 amostras do ponto B. O protocolo para a análise seguiu a seguinte ordem: Diluição das amostras em MeOH 48% (partir de 1:300 e ajustar a diluição caso necessário para não extrapolar a curva padrão); adicionar 200 μ L da amostra ou branco (MeOH 48%) em microplaca preta; leitura em espectrofluorímetro (UV-1650PC, Shimadzu) nos comprimentos de onda de excitação/emissão presentes na Tabela IV.3.

Tabela IV.3. Comprimento de onda específico para cada composição aromática do HPAs.

Anéis	λ (nm)	Faixa de trabalho	Equação da reta
2	288/330	46 a 3000	$y = 1,1338x$
3	267/309	78 a 5000	$y = 0,7377x$
4	334/376	62 a 4000	$y = 2,4305x$
5	364/406	46 a 3000	$y = 11,841x$
6	380/422	15 a 1000	$y = 37,696x$

A curva padrão foi preparada a partir do padrão comercial 47930-U (Supelco) contendo a mistura dos analitos (16 HPAs prioritários na concentração de 2mg mL⁻¹) seguindo as faixas de trabalho presentes na Tabela 3, e a quantificação a partir da fórmula presente no Quadro 1 a seguir:

Quadro 1:

$$[\text{HPAs}] = \frac{((\text{média-branco}) / \text{equação da reta para o anel})}{[\text{Proteína}] \times \text{Diluição}}$$

A concentração de proteína das amostras foi realizada utilizando o reagente de Bradford adicionando-se 250µL de reativo em 10 µL de amostra diluída. Os resultados finais são expressos em ng HPA mg prot⁻¹.

4.8. Tratamento estatístico

As diferenças entre os grupos amostrados foram verificadas a partir do teste não paramétrico Mann-Witney após a verificação da normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. A integração dos dados foi avaliada através do índice de correlação de Spearman com nível de significância de $p < 0,05$ sendo considerados fortemente significativos: $p \geq 0,70$; moderadamente significativos: p entre 0,3 e 0,7; e fracamente significativa: $p \leq 0,3$. Os fatores que influenciam na distribuição entre os pontos através da análise de componentes principais (PCA). Todos os parâmetros estatísticos foram avaliados através do programa Statistica 7.0., com nível de significância de ($p < 0,05$), e os gráficos construídos a partir do programa Origin 8.

5. Resultados e Discussões

5.1. Quantificação de BTs

Os resultados obtidos na quantificação de BTs em amostras de fígado do peixe *C. spixii* estão presentes na Tabela IV.4.

Tabela IV.4. Quantificação de BTs em amostras de *C. spixii* amostradas na Baía de Paranaguá: (A)Porto de Paranaguá; (B)Ponta do Poço. Resultados expressos em ng g⁻¹ (w.w).

Amostra	TBT	DBT	MBT	ΣBTs	%TBT
A1	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
A2	52	n.d.	n.d.	52	100
A3	171	n.d.	n.d.	171	100
A4	62	n.d.	n.d.	62	100
A5	90	n.d.	n.d.	90	100
A6	123	n.d.	n.d.	123	100
A7	176	n.d.	n.d.	176	100
A8	330	n.d.	n.d.	330	100
A9	201	n.d.	n.d.	201	100
A10	259	n.d.	n.d.	259	100
Min	n.d.	-	-	n.d.	-
Max	330	-	-	330	-
B1	89	272	n.d.	361	25
B2	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
B3	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
B4	78	n.d.	n.d.	78	100
B5	125	32	<LQ	157	79
B6	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
B7	66	48	n.d.	114	58
B8	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
IB9	56	n.d.	n.d.	56	100
B10	107	n.d.	<LQ	107	100
Min	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
Max	125	272	-	361	-

n.d. não detectado; <LQ: abaixo do limite de quantificação (vide Tabela II.9).

Os dois grupos de amostragem apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de TBT encontradas ($p < 0,05$), sendo concentrações maiores para o ponto

A, referente ao Porto de Paranaguá (52 a 330 ng g⁻¹). Neste ponto não foram observados os produtos de degradação DBT e MBT em nenhuma das amostras. Esses resultados podem ser resultantes da entrada recente desses compostos nessas regiões ou mesmo da preservação do TBT em sedimentos desses locais caracterizados como altamente redutores (SANTOS et al., 2009). No ponto B também foram detectadas concentrações de TBT variando entre 56 a 125 ng g⁻¹, no entanto, neste ponto, a presença de DBT também pode ser observada (32 a 272 ng g⁻¹).

Como previamente discutido no Capítulo III, o bagre *C. spixii* caracteriza-se por ser estuarino residente podendo, porém migrar ao longo do estuário em épocas reprodutivas ou para forrageio (COSTA et al., 2004), sendo exemplares maiores encontrados na entrada do estuário (BARLETTA et al., 2008). Por se tratar de um organismo com hábitos demersais, sua alimentação está baseada principalmente em invertebrados bentônicos tais como moluscos, crustáceos e poliquetas além de ser comumente encontrada grandes quantidades de sedimento em seu conteúdo estomacal por assimilação acidental (OLIVEIRA et al., 2005). A assimilação do TBT diretamente via cadeia trófica também é possível pela baixa capacidade de metabolização desse composto atribuída aos invertebrados que constituem a sua dieta.

As concentrações de BTs nos fígado de *C. spixii* encontradas nessa amostragem realizada no ponto A, em julho de 2011, difere daquelas encontradas na amostragem realizada em junho de 2009 na mesma região (Capítulo III), onde foram detectados 71 ng g⁻¹ de TBT e 302ng g⁻¹ de DBT. Na amostragem de 2009, o ponto mais próximo daquele amostrado em 2011 refere-se ao PNG1 onde foram encontradas concentrações de 66 ng g⁻¹ para o TBT e de 107 ng g⁻¹ para o DBT. Entretanto, na amostragem reportada no capítulo III, foi realizada a quantificação a partir do pool de 20 indivíduos e não a cada 2 exemplares de *C. spixii*.

Assim como em 2009, no ano de 2011 o MBT não foi detectado em nenhuma das amostras de fígado de *C. spixii* desse sistema estuarino, sugerindo a maior excreção desse composto em decorrência de sua maior polaridade e menor hidrofobicidade, sendo mais facilmente eliminado pelo sistema metabólico.

Como mencionado no capítulo anterior, atividades de dragagem são constantes na região e, em janeiro de 2011 houve uma dragagem emergencial nos berços de atracação do Porto de Paranaguá para aumento do calado. Dessa forma, a contaminação mais antiga (pré-banimento das tintas) pode ter sido exposta. De acordo com Langston et al. (2009), em porções (“cores”) mais profundos de sedimentos estuarinos, a taxa de

degradação do TBT diminui sendo que a proporção desse composto pode chegar a 89% em cores de 10 a 15 cm após 4 anos da exposição. Dessa forma, o TBT antes preservado em regiões mais profundas de sedimento torna-se biodisponível para organismos bentônicos tais como os bagres.

A ocorrência de DBT no fígado de peixes do ponto B pode estar associada a distribuição dos BTs normalmente encontradas em sistemas estuarinos (Capítulo III). Em sedimentos mais afastados de fontes potenciais de entrada de TBT são mais comumente encontrados seus produtos de degradação em virtude do transporte hidrodinâmico de partículas de sedimento ao longo do sistema estuarino (FELIZZOLA et al., 2008). Em sedimentos superficiais, Santos et al. (2009), detectou elevadas concentrações ($\sim 500 \text{ ng g}^{-1}$) dos produtos de degradação DBT e MBT em regiões mais próximas à entrada desse sistema estuarino (Ponto B) assim como elevadas concentrações de TBT no canal de navegação principal da Baía. No entanto, as maiores concentrações de TBT em sedimentos superficiais foram atribuídas à região do Porto de Paranaguá (Ponto A) com concentração média de $1307 \text{ ng TBT g}^{-1}$.

A ausência de produtos de degradação na maioria das amostras quantificadas pode indicar a baixa metabolização desses compostos resultante da inibição do sistema monooxigenase citocromo P450 pela concentração elevada de TBT (IKEDA e YAMADA, 2003; OHJI et al., 2006) e que será discutida em seguida, assim como resultar da assimilação recente, diretamente dos sedimentos, onde o TBT permanece fortemente adsorvido.

No estudo realizado por Gosz et al. (2011) no Mar Báltico utilizando o linguado (*Scophthalmus maximus*), peixe com hábitos semelhantes aos bagres, o TBT e DBT estiveram presentes no testículo, fígado e músculo desse organismo, sendo o MBT em níveis abaixo do LD. Nesse estudo, machos amostrados em área considerada referência apresentaram concentrações 2 a 4 vezes menores de TBT do que a encontrada em locais contaminados e a presença em regiões afastadas foi atribuída a mobilidade de peixes dentro do sistema, atingindo regiões próximas a fontes de entrada desses compostos, fato que pode também estar relacionado aos resultados obtidos no presente estudo.

5.2. Enzimas

Os resultados médios obtidos na dosagem da atividade enzimática da EROD não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre os pontos, assim como aqueles encontrados para a GST. Este resultado pode ser decorrente da grande variabilidade enzimática presente mesmo em organismos da mesma espécie, além da combinação entre fatores bióticos e abióticos a que esses organismos estão expostos em cada um dos pontos (GOKOYR e FORLIN 1992). Apesar da baixa divergência, os maiores valores foram encontrados para EROD e GST no ponto B (9,64 pmol min^{-1} e 130 nmol min^{-1} respectivamente) em relação ao ponto A (7,98 pmol min^{-1} e 122 nmol min^{-1} respectivamente) (Figura IV.5).

Figura IV.5. Valores de atividade da EROD e GST dosados no fígado do bagre *C. spixii*: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.

Como previamente mencionado, no ambiente estuarino existem uma diversidade de contaminantes (xenobióticos) capazes de desencadear o aumento de atividade enzimática do sistema P450 tais como alguns metais (Hg), HPAs e pesticidas. No entanto, o TBT possui um efeito antagonista, inibindo a atividade dessas enzimas, o que o caracteriza como um contaminante de ação anti-estrogênica.

A EROD é considerada como um biomarcador de resistência, observado após a exposição a longo prazo, visando a adaptação e resposta a presença do contaminante (HANSEN, 2003). Como discutido no capítulo III, em decorrência dos resultados obtidos nesse trabalho assim como aqueles obtidos por Santos et al. (2009), a presença de BTs em Paranaguá tem se demonstrado crônica através dos anos, apesar da redução

dos níveis desses compostos nos sedimentos ser verificada após o banimento das principais fontes destes compostos em 2008.

A correlação entre o conteúdo de TBT no fígado dos bagres estuarinos e a atividade enzimática da EROD em *C. spixii* demonstrou uma correlação linear inversamente proporcional (-0,16). Através deste resultado podemos verificar que no ponto A o metabolismo desses organismos pode estar inibido e influenciado pela maior concentração de TBT presente no fígado de *C. spixii*. Entretanto, essa inibição pode estar correlacionada com outros agentes inibidores desse sistema, como por exemplo, o Arsenito- As(III) (THOMPSON et al., 2010). De acordo com Anjos (2006) e Sá (2004), compostos de arsênio vem sendo amplamente encontrados na Baía de Paranaguá sendo resultantes de processos diagenéticos ou pelo aporte decorrente de atividades antrópicas presentes na região portuária (Fospar), onde são encontradas as maiores concentrações desse elemento na água e sedimentos.

A redução do CYP hepático foi observada por Shim et al. (2003) em linguados (*Paralichthys olivaceus*) expostos ao TBT, fato também observado por Shimasaki et al. (2003) e Lyssimacou et al. (2006). Em *Sebasticus marmoratus* foi observado um aumento dos níveis de testosterona em relação ao 17 β -estradiol assim como um atraso no processo de oogênese decorrente da inibição da aromatase pelo TBT (ZHANG et al., 2007), assim como exposto na Figura IV.1 deste capítulo. Além do TBT, os produtos de degradação DBT e MBT também podem ser considerados inibidores da atividade da EROD em peixes *in vitro*, porém em menores intensidades, agindo no nível de proteína e não diretamente no receptor Ah (BRÜSCHWEILER et al., 1996).

De acordo com Shim et al. (2003), concentrações de 3,65 ng L⁻¹ são suficientes para afetar o conteúdo de P450 em linguados (*Paralichthys olivaceus*). Em sargos (*Stenotomus chrysops*), a atividade da EROD foi inibida nas doses intraperitoniais de 3,3 a 16,3 mg Kg⁻¹ de TBT. As concentrações encontradas no fígado dos peixes amostrados no ponto A são inferiores a esses valores porém, demonstraram uma correlação significativa na atividade da EROD, o que indica a importância do monitoramento ambiental utilizando biomarcadores específicos associados a dosagem dos BTs além do estudo realizado a partir de bioensaios, quando as concentrações encontram-se geralmente acima daquelas encontradas no ambiente.

A inibição da GST, enzima de fase II da biotransformação, pode ser ocasionada pela conjugação direta do TBT com a glutathione reduzida (GSH), ligando-se ao grupo SH e tornando-o indisponível para a atividade da GST (HAMED et al., 2003;

ISHIHARA et al., 2012). No fígado de *Sebasticus marmoratus*, concentrações de 482 ng g⁻¹ de TBT foram capazes de inibir esta enzima após 2 dias de exposição (WANG et al., 2005). De acordo com o autor, em menores doses houve a indução da GST e, após exposições prolongadas, o TBT foi capaz de ser metabolizado a DBT e MBT. Assim como para a EROD, no ponto A foram observados menores valores de atividade da GST em relação aos valores encontrados para o ponto B.

Entretanto, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela em decorrência da ausência de variação temporal assim como a ausência de bioensaios específicos que correlacionem diretamente o TBT com a espécie estudada. Além disso, dentre os estudos realizados em condições controladas de exposição em laboratório também existem divergências que dificultam a interpretação dos resultados obtidos neste estudo.

Embora a inibição sistema MOF relacionada ao TBT seja bastante conhecida e reportada (AL-GHAIS e ALI, 1999; MORTENSEN e ARWKUE, 2007), de acordo com Padrós et al., (2003) peixes expostos a baixas concentrações de TBT (300 ng g⁻¹) apresentaram um aumento da atividade da EROD. Wang et al., (2005) também observou uma indução da GST em baixas doses de TBT (3,8 a 18 ng g⁻¹) enquanto houve uma tendência a inibição em elevadas doses (482 ng g⁻¹) assim como reportado também por Al-Ghais e Ali (1999) onde 7,4 µM de TBT foi responsável pela redução de 50% da atividade desta enzima. De acordo com Fonseca et al. (2011) a atividade da GST pode aumentar até uma dada concentração e em seguida diminuir, o que sugere que em peixes, o limiar para a indução seja até 300ng TBT g⁻¹. Além disso, um aumento da GST pode ser ocasionado pela presença de outros contaminantes no meio, tais como os HPAs. Dessa forma, os resultados obtidos em campo podem sugerir que a concentração de TBT assimilada por *C. spixii* no ponto A já possa ser suficiente para que seja possível a inibição do sistema metabólico, mesmo na presença de outros contaminantes que possuam efeito antagonista ao TBT.

Os resultados obtidos na análise de LPO estão presentes na Figura IV.6. A diferença encontrada entre os pontos amostrais não apresentaram significativas ($p < 0,05$), porém os maiores valores (e variações) estiveram relacionadas ao ponto A, próximo ao Porto de Paranaguá.

Figura IV.6. Dosagem de LPO no fígado de *C. spixii* amostrado em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.

O estresse oxidativo em peixes e seu potencial diferem entre as espécies, habitat e comportamento alimentar, sendo que em áreas contaminadas é comum encontrar uma maior peroxidação lipídica (FONSECA et al., 2011; BEN AMEUR et al., 2012). De acordo com Ishihara et al. (2012), o TBT é capaz de promover o estresse oxidativo e a elevada lipoficidade do TBT faz com que ocorra uma rápida permeabilidade através da membrana, afetando o ambiente intracelular e induzindo a citotoxicidade (GADD, 2000). No entanto, no ambiente estuarino existe uma diversidade de contaminantes capazes de induzir este efeito sobre a célula e que juntos podem desencadear efeitos tóxicos mais intensos (LIVINGSTONE, 2001). De acordo com Wang et al. (2006) peixes são mais vulneráveis ao estresse oxidativo quando expostos a combinação de BaP e TBT do que quando expostos separadamente.

O bagre *C. spixii* amostrado no ponto B, localizado na porção mais afastada do Porto de Paranaguá, apresentou uma hiperoxidação (LPO) equivalente àquele encontrado para o ponto A. Nas proximidades deste ponto, além da presença de BTs nos sedimentos, como reportada no capítulo anterior (III), a presença de DBT no fígado de peixes amostrados e a contaminação por HPAs de origem petrolítica (ex. naftaleno) provenientes da região portuária e que sofrem transporte ao longo do sistema estuarino, podem ser os maiores responsáveis pelos níveis de LPO detectados. De acordo com Silva (2007), em estudos envolvendo *Astyanax sp.*, com o aumento da GST (como a observada para o ponto B) foi observada uma diminuição da LPO resultante da

conjugação dos contaminantes e consequente eliminação, combatendo os danos causados pelo estresse oxidativo (CLEMENTE, 2009). Os resultados encontrados para este biomarcador serão abordados novamente na seção de resultados integrados.

5.3. Dosagem de HPAs na bile

Para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos para a EROD, foi realizada a dosagem semiquantitativa de HPAs na bile cujos resultados estão presentes na Figura IV.7.

Figura IV.7. Concentrações de HPAs por anéis aromáticos, detectadas na bile de *C. spixii* amostrados em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço. Detalhe: Concentração média do Σ HPAs.

A quantificação de HPAs na bile de *C. spixii* (em mg de proteína), foi semelhante àquela encontrada por Patire (2010), na bile de *Mugil curema* com 82,36 e 8,73 $\mu\text{g g}^{-1}$ de bile respectivamente para 2 (Naftaleno), 3 (Fenantreno) amostrados em Santos assim como no estudo de Albergaria- Barbosa (2009) realizado na mesma região com espécies de hábitos semelhantes. Esses resultados semelhantes apontam para um impacto desses compostos na Baía de Paranaguá semelhante àquele encontrado na Baía de Santos, e referentes a fontes petrogênicas tais como exploração, transporte por navios e tubulações, distribuição de seus derivados associados a derrames acidentais, descarte de efluentes industriais e urbanos (MENICONI, 2007).

A presença de HPAs totais em sedimentos vem sendo reportada em toda a Baía de Paranaguá (FROHENER et al., 2011). Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os pontos de amostragem ($p < 0,05$), sendo o HPAs mais representativos aqueles compostos por 2 anéis tais como o naftaleno. Apesar da diferença não significativa entre os pontos é possível observar concentrações mais elevadas em amostras referentes ao Ponto B, (exceto para os HPAs de 6 anéis), resultado que condiz com os maiores valores de atividade enzimática da EROD encontrados também neste ponto uma vez que esses compostos são reconhecidos como estrogênicos aumentando a atividade da aromatase, efeito antagonista ao TBT (CHOVANEC et al., 2003; PADRÓS et al., 2003).

Apesar do efeito antagonista, os níveis de HPAs no ponto (A) ou mesmo de qualquer outro agente estrogênico não foram suficientes para aumentar a atividade enzimática da EROD. De acordo com Padrós et al. (2003), o TBT inibe o metabolismo e bioativação do BaP através da inibição da indução do P4501A mediada pela atividade da EROD. Assim, a presença de HPAs na bile, possível através do processo de biotransformação, pode estar inibido pela presença de elevadas concentrações de TBT encontrada no fígado desses organismos (FENT, 1999).

O aumento da atividade da EROD foi observado em enguias (*Zoarces viviparus*) expostas a HPAs em regiões costeiras da Dinamarca sendo as maiores concentrações detectadas em machos (TAIROVA et al., 2012). Também foi observado o aumento da EROD em linguados (*Platichthys flesus*) após um mês de exposição a 50 mg Kg^{-1} de HPAs através da alimentação assim como o aumento na concentração de metabólitos desses compostos quantificados na bile (REYNOLDS et al., 2003).

Por outro lado, da mesma forma que para os BTs, a indução do sistema metabólico relacionada aos HPAs possui inúmeras divergências. A indução do P450 em carpas investigadas por Van der Widen et al. (1993), não foi afetada significativamente pela presença de concentrações entre 0,29 e $0,91 \text{ mg Kg}^{-1}$ de HPAs em sedimentos. Ramsdorf (2011) também não observou a indução da atividade enzimática da EROD em jundiás expostos a diferentes concentrações de naftaleno. Padrós et al. (2003) observou os efeitos no metabolismo de peixes expostos à concentrações de benzo-a-pireno (BaP) e TBT e seus efeitos sinérgicos sobre a espécie *Salvelinus alpinus* (truta). Este estudo demonstrou que a utilização de biomarcadores no monitoramento da contaminação por TBT deve ser avaliada com cautela uma vez que a presença de BaP nos organismos estudados estimulou o metabolismo de fase II do TBT e sua excreção através da bile

onde apresentou um aumento de 200%. Assim, enquanto o TBT inibe a bioativação do BaP, este estimula o metabolismo de fase II do TBT e sua excreção, dificultando a interpretação principalmente relacionada a estudos de monitoramento.

5.4. Histopatologia

Além do impacto no metabolismo de xenobióticos, os BTs podem ainda ser responsáveis por lesões estruturais em organismos expostos a esses contaminantes resultantes de sua exposição crônica. Os resultados individuais obtidos na análise histopatológica do fígado de *C. spixii* amostrados na Baía de Paranaguá envolveu as seguintes lesões: necrose (N), resposta inflamatória (RI), neoplasia (NP) e parasitas (P) (Figura IV.8). Na Tabela IV.5. estão presentes o número de ocorrências e as porcentagens de lesões nos dois locais amostrados.

Figura IV.8. Secção transversal do fígado de *C. spixii* corado com HE: (A) ML e infiltração leucocitária; em detalhe: CMM; (B) Necrose e presença de parasitas. Barra: escala 50µm.

Tabela IV.5. Incidência de lesões e sua porcentagem em indivíduos de *C. spixii* amostrados em Paranaguá-PR.

Lesões	A (Porto)		B (Ponta do Poço)	
	N	(%)	N	(%)
Necrose	18	100	15	84
Resposta Inflamatória	4	22	8	42
Neoplasia	1	6	0	0
Parasitas	5	27	7	36

Utilizando os valores médio obtidos através do Índice de Bernet (Organ Index) (BERNET et al., 1999) foram observados os escores presentes na Figura IV.9 assim

como a contagem de CMM/ML para os dois pontos amostrais. Através do teste Mann-Witney foi observada uma diferença não significativa ($p < 0,05$) entre os escores médios obtidos para o índice de Bernet. No entanto, observa-se uma maior incidência (100%) de tecidos necrosados referentes ao ponto A (mais impactado), assim como a ocorrência de uma amostra contendo neoplasia maligna, lesão ausente no ponto B.

Figura IV.9. Índice médio de lesões obtidos através do I_{org} de Bernet et al., (1999) e ocorrência média de CMM/ML no fígado de *C. spixii* amostrados em Paranaguá-PR: (A)Porto de Paranaguá; (B)Ponta do Poço.

De acordo com Fernandez et al. (2011), as lesões mais representativas em peixes são injúrias irreversíveis que possam ocasionar uma perda total ou parcial do funcionamento do órgão atingido. A necrose pode ser responsável por danos semelhantes uma vez que ocasiona disfunções estruturais e funcionais que levam ao comprometimento da saúde e sobrevivência dos organismos (RABITTO et al., 2005; SILVA, 2010). Ela é geralmente a lesão mais expressiva encontrada no fígado (RABITTO et al., 2005; VALDEZ DOMINGOS et al., 2009), e está geralmente associada peixes amostrados em regiões impactadas por diversos contaminantes (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; KATSUMITI et al., 2008).

A exposição a contaminantes orgânicos tais como HPAs e BTs em peixes vêm demonstrando correlação significativa com lesões hepáticas presentes no fígado (INZUNZA et al., 2006; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2007). Oliveira Ribeiro et al. (2009) observou os efeitos morfológicos da exposição a TBT e DBT em linguados (*Hipposglossoides platessoides*) via cadeia trófica assim como bioacumulação no músculo, sendo observada uma capacidade de metabolização desses BTs por esse organismo demersal e acúmulo apenas do TBT no músculo. Os peixes expostos

apresentaram áreas necróticas após 8 doses de 30ng g^{-1} via alimentação, também observadas no estudo realizado em trutas expostas somente ao TBT.

Entretanto a detecção do DBT no fígado de *C. spixii* amostrados no ponto B também pode ser um dos responsáveis pela incidência de lesões no tecido desses organismos uma vez que peixes expostos a apenas esse composto podem apresentar áreas necrosadas ainda mais significativas como observado no fígado de linguados expostos a esse composto (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2009), indicando que o DBT pode ser mais tóxico do que o TBT no nível celular.

A estrutura normal do fígado é caracterizada pela presença de sinusóides circulares com um fino endotélio envolvido pelos hepatócitos cujo citoplasma contém glicogênio e lipídios (DABROWSKA et al., 2012). A elevada incidência de necroses observadas nos tecidos de *C. spixii* assim como a incidência de parasitas pode ser responsável pela resposta inflamatória desencadeada a partir da exposição aos BTs nesses organismos uma vez que a necrose implica no recrutamento de leucócitos que estão diretamente associados à ocorrência de CMM (RABITTO et al., 2005; SILVA, 2010).

Como observado na Figura IV.9, nas amostras de *C. spixii*, a contagem de ML não apresentou diferença significativa entre os pontos A e B ($p < 0,05$). No entanto, para os CMM essa diferença mostrou-se significativa ($p = 0,015$) uma vez que foi superior nos peixes amostrados no ponto mais impactado (A), indicando a maior exposição desses organismos a contaminantes.

Em peixes, os CMMs podem se desenvolver em associação a lesões inflamatórias crônicas, estando associados à exposição por xenobióticos, especialmente aqueles associados ao estresse oxidativo (AGIUS e ROBERTS, 2003; VALDEZ DOMINGOS et al., 2009), incluindo o TBT (AL-GHAIS e ALI 1999). Além da idade e espécie, a presença dessas estruturas está correlacionada a processos de detoxificação pela ocorrência de xenobióticos, radicais livres, doenças e escassez de alimento (CHOVANEC et al., 2003).

Um número maior de CMMs em regiões consideradas contaminadas também foi observado no estudo desenvolvido por Dabrowska et al. (2012), utilizando linguados como biomonitorios. Entretanto, as lesões no fígado não específicas foram observadas em todos os grupos analisados e, de acordo com o autor, essas lesões estiveram associadas a efeitos sazonais, relacionadas ao status biológico do peixe ou a mudanças nas condições ambientais. De acordo com Fournie et al. (2001), a ocorrência de 40

CMM mm² no baço de bagres no México indicou o ambiente como altamente degradados. Nesse estudo, a média para o ponto A (Porto) foi de 10CMM mm² enquanto que para o ponto B (Ponta do Poço) a média foi de 5CMM mm², incidências inferiores às aquelas encontradas por aquele autor.

A histopatologia do fígado de *C. spixii* já foi investigada na Baía de Paranaguá. No estudo desenvolvido por Valdez Domingos et al. (2009) envolvendo essa espécie amostrada em duas regiões da Baía (contaminada e referência) não foram observadas diferenças significativas entre a contagem de CMM das áreas amostradas assim como para o índice de lesões, indicando que o sistema estuarino em questão encontra-se amplamente impactado. Da mesma forma Katsumiti et al. (2009) verificou alterações morfológicas e genéticas em *C. spixii* também amostrados tanto em área considerada referência (Baía das Laranjeiras) quanto impactada (Porto de Paranaguá), atribuindo esse impacto aos HPAs e à distribuição de contaminantes ao longo do sistema estuarino através da hidrodinâmica local.

Entretanto, as diferenças significativas encontradas para este biomarcador coincidem com aquelas encontradas na dosagem de TBT no fígado de *C. spixii* e este parâmetro será discutido na seção 5.8 através da análise de correlação e multivariada.

5.5. Genotoxicidade

Os resultados obtidos na análise do ensaio cometa em fígado estão apresentados na Figura IV.10, sendo considerados diferentemente significativos ($p < 0,05$). Efeitos genotóxicos são considerados como biomarcadores resultantes da exposição recente a xenobióticos, sendo úteis em diagnósticos precoces da saúde dos peixes, tendo elevada relevância ecológica (HANSEN, 2003), uma vez que o dano genético pode ocasionar mutações que influenciam na adaptação de populações de peixes no ambiente aquático (MOCHIDA e FUJII, 2009).

Figura IV.10. Escores do ensaio cometa obtidos em hepatócitos de *C. spixii* amostrados em Paranaguá-PR: (A) Porto de Paranaguá; (B) Ponta do Poço.

Ferraro et al. (2004) em bioensaio utilizando traíras (*Hoplias malabaricus*) expostas a concentração de 300 ng g^{-1} (b.w.) de TBT observou uma menor incidência de cometa em eritrócitos de organismos expostos a esse contaminante do que o controle, encontrando diferenças significativas na incidência de alterações nucleares, com TBT apresentando o dobro de ocorrências em relação ao grupo controle. No entanto, Tiano et al. (2001) encontrou efeito genotóxico em eritrócitos do peixe *Salmo irideus* expostos ao TBT, sendo este efeito menos pronunciado para o DBT e ausente para o MBT.

A ocorrência de danos ao DNA foi superior nos peixes amostrados no ponto B, onde foram detectadas menores concentrações de TBT. Neste ponto foi observada a presença de DBT assim como as maiores concentrações de HPAs, contaminantes comumente relacionados à ocorrência desta lesão (TIANO et al., 2001; MĪCĪC et al., 2002). Entretanto, Katsumiti et al. (2009) não observou aumento de danos ao DNA através da quantificação de micronúcleos e ensaio cometa em *C. spixii* após a exposição decorrente de um derramamento de petróleo (explosão do navio chileno Vicuña) ocorrido em 2004 em Paranaguá-PR.

Amado et al. (2006) verificou que o DNA de corvinas (*Micropogonias furnieri*) não é eficientemente reparado no inverno em áreas poluídas indicando elevados níveis de mutações nesses peixes associadas a quebras não reparadas. Segundo o autor, danos permanentes podem ser ocasionados a partir da exaustão do sistema de reparo de DNA em peixes expostos a elevados níveis de contaminantes. Como a coleta

foi realizada no período de inverno, os valores obtidos podem ser decorrentes desse processo.

5.6. Fator de Condição

Os exemplares de *C. spixii* amostrados não variaram significativamente em tamanho, porém diferiram de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao peso dos indivíduos, sendo os maiores amostrados no ponto B (23 a 200g) composto por 70% de machos. Já no ponto A, a incidência de fêmeas foi muito superior (65%) em relação aos machos amostrados. A presença de peixes com o mesmo tamanho, porém com pesos maiores no ponto B pode ser resultante, a princípio, das melhores condições ambientais presentes nessa área, mais afastada de fontes potenciais de contaminação.

Fatores de condição (CF) têm sido utilizados em diversos estudos de monitoramento sendo encontrados valores superiores em regiões consideradas como não impactadas (FLAMMARION et al., 2002; DABROWSKA et al., 2012; VAN DYK et al., 2012). Aplicando-se o CF nos bagres *C. spixii* amostrados em Paranaguá obtém-se um valor de $0,007 \pm 0,0009$ para o ponto A e de $0,008 \pm 0,001$ para o ponto B. Dessa forma, a redução do CF em peixes amostrados no ponto A é esperada uma vez que menores valores são comumente encontrados em locais de maior susceptibilidade a interferência de xenobióticos, pois, estes afetam diretamente o metabolismo e o nível de estresse dos organismos expostos à esses compostos.

A utilização do fator de condição, embora geral e não específico, em peixes possibilita o estabelecimento de relações entre as condições ambientais e aspectos comportamentais da espécie, refletindo o bem estar do peixe e partindo-se do princípio de que peixes com o mesmo comprimento e maiores pesos estariam vivendo sobre condições mais favoráveis, seja de disponibilidade de alimento ou influência de contaminantes no metabolismo desses organismos (VAZZOLER, 1996; SILVA, 2010; BEN AMEUR et al., 2012).

No estudo de Valdez-Domingos et al. (2009), utilizando *C. spixii* como biomonitor em área considerada impactada e não impactada em Paranaguá, a diferença entre o CF foi mais evidente uma vez que foi utilizado como ponto controle a Baía das Laranjeiras, região ainda mais afastada das principais fontes de contaminação nesse sistema estuarino. Em outro estudo envolvendo *C. spixii*, o CF amostrado em um estuário menos impactado (Cananéia-SP) apresentou maiores valores do que os

amostrados no estuário menos impactado (Santos/São Vicente) pela entrada de contaminantes (AZEVEDO et al., 2009).

No entanto, apesar de historicamente menos impactado em relação ao Porto de Paranaguá, a região do ponto B também sofre o impacto de contaminantes provenientes da região mais interna do estuário através do transporte hidrodinâmico desse sistema, previamente discutido no capítulo III.

5.7. Resultados Integrados

De acordo com Markert et al. (2003), a discussão a respeito dos riscos atribuídos a entrada de contaminantes em sistemas complexos deve ser interdisciplinar e, para que isso seja viável deve ser realizada a integração dos dados (MARKERT et al., 2003). No entanto, sabe-se que a contaminação de um ambiente raramente é resultante de apenas um composto, mas sim da mistura de contaminantes (ALTENBURGER e SCHMITT-JANSEN, 2003) que possuem efeitos sinérgicos e antagônicos dificultando a predição do real impacto do composto investigado sobre os organismos (CHOVANEK et al., 2003).

Através do índice de correlação de Spearman (Tabela IV.6), foi observada uma correlação moderadamente significativa e de forma positiva entre a concentração de TBT no fígado dos peixes com a variável CMM enquanto os fatores com significância moderadamente negativa foram: CT, MT, EROD, RI, cometa de fígado e $\sum$ HPAs.

A correlação negativa entre a concentração de TBT e a EROD já foi previamente discutida (seção 5.3), porém, através do índice de correlação podemos observar que ela é considerada moderadamente significativa (-0,31). Já para GST não foi observada correlação com o TBT, indicando que as concentrações detectadas no fígado desses organismos não interferem na dosagem desta enzima de biotransformação. De acordo com Ahmad et al. (2004) mediante longos períodos de exposição pode ocorrer uma falta de correlação metabólica entre as enzimas de biotransformação com a inibição da EROD e inalteração da GST em decorrência do dano causado ao tecido.

Tabela IV.6. Índice de correlação de Spearman ($p < 0,05$) correlacionando biomarcadores e as concentrações de BTs mensurados no bagre *C. spixii* em Paranaguá-PR. Em negrito: correlação moderadamente significativa; sublinhado: correlação fortemente significativa.

	CT	MT	TBT	DBT	EROD	GST	LPO	CMM	ML	RI	Necrose	Parasitas	I _{org}	Cometa	ΣHPAs
CT	1,00														
MT	<u>0,93</u>	1,00													
TBT	-0,54	-0,58	1,00												
DBT	0,34	0,42	-0,04	1,00											
EROD	0,37	0,40	-0,31	-0,15	1,00										
GST	0,39	0,41	-0,20	0,21	0,12	1,00									
LPO	-0,05	-0,13	0,17	-0,03	0,14	-0,32	1,00								
CMM	-0,47	-0,56	0,42	-0,30	-0,31	-0,36	0,32	1,00							
ML	-0,09	-0,18	-0,07	-0,31	0,03	-0,09	0,18	<u>0,72</u>	1,00						
RI	0,14	0,13	-0,45	-0,02	0,17	0,10	0,00	-0,13	0,10	1,00					
Necrose	-0,37	-0,34	0,05	-0,27	-0,22	-0,26	-0,18	-0,00	-0,15	0,55	1,00				
Parasitas	0,02	-0,05	0,00	-0,01	-0,06	-0,40	0,15	0,19	0,06	0,27	0,39	1,00			
I _{org}	-0,35	-0,32	0,02	-0,28	-0,18	-0,29	0,16	-0,00	-0,13	0,56	<u>0,99</u>	0,43	1,00		
Cometa	0,60	0,54	-0,37	0,34	0,10	0,05	0,12	-0,24	-0,26	0,07	-0,11	0,10	-0,12	1,00	
ΣHPAs	0,66	0,62	-0,48	0,43	0,19	0,17	0,17	-0,46	-0,32	0,26	-0,02	0,23	-0,02	<u>0,86</u>	1,00

A GST, por sua vez, esteve inversamente relacionada a dosagem de LPO (-0,32) o que corrobora com os resultados obtidos por Silva (2007) em bioensaios envolvendo o lambari *Astyanax sp* expostos a contaminantes orgânicos, onde com o aumento da GST ocorreu uma diminuição da LPO sugerindo que os poluentes presentes podem estar sendo conjugados pela fase II do sistema metabólico.

As interferências na atividade catalítica ou expressão da aromatase associadas ao TBT ou seus antagonistas podem ser denominadas como processos de alteração endócrina que interferem em diversos processos tais como a maturação de espermatozoides, masculinização e feminilização (LYSSIMACOU et al., 2006) que influenciam diretamente o sucesso reprodutivo e sobrevivência das espécies impactadas.

Como mencionado anteriormente, concentrações de TBT detectadas (acumuladas) no tecido do bagre *C. spixii* encontradas no ponto A podem ser suficientes para reduzir a atividade da EROD e, a ausência de produtos de degradação nesses tecidos pode ser atribuída a essa inibição. Por outro lado, no ponto B, que apresentou concentrações de TBT significativamente inferiores, o metabolismo pode não estar inibido, apresentando inclusive produto de degradação DBT no fígado dos bagres.

De acordo com Mortensen e Arukwe (2007), elevadas concentrações de TBT podem ainda diminuir os receptores estrogênicos α (ER α) e aril hidrocarboneto α

(AhR α). Essa inibição, entretanto, irá depender da assimilação desses compostos assim como da presença de outros xenobióticos que também podem interferir no sistema metabólico com efeitos agonistas e antagonistas ao TBT.

A inibição do receptor AhR α desencadeada pela exposição ao TBT refletirá consequentemente no metabolismo dos HPAs. A correlação negativa entre as concentrações de TBT e Σ HPAs na bile pode ser observada (-0,48), o que pode indicar uma inibição do metabolismo desses compostos, sendo estes observados em maiores concentrações no ponto B, onde as concentrações de TBT não são suficientes para inibir a biotransformação. No entanto, o contrário também é comumente observado, uma vez que elevadas concentrações de BaP em peixes expostos ao TBT são capazes de aumentar o metabolismo de fase II (PADRÓS et al., 2003).

O TBT esteve diretamente relacionado (0,42) com a incidência maior de CMM presentes no ponto A (Porto de Paranaguá). No estudo envolvendo o bagre *Clarias gariepinus*, os CMM estiveram associados a regiões necróticas e presentes em mais de 50% das amostras de fígado tanto amostrados em locais considerados contaminados quanto não contaminados na África do Sul não estando associadas a nenhum contaminante específico (VAN DYK et al., 2012). Entretanto, a elevada ocorrência de CMM foi reportada por Rabitto et al. (2005) após a exposição ao TBT.

De acordo com Wishkovsky et al. (1989) a exposição de corvinas (*Micropogonias undulatus*) a concentrações de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TBT são suficientes para diminuir a atividade fagocitária de células de rim *in vitro*. Em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a concentrações de 0,6 a 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TBT não foi observada correlação significativa entre a incidência de lesões hepáticas tais como a necrose (SCHWAIGER et al., 1992), indicando que a resposta é dependente da espécie utilizada no teste.

Embora Oliveira Ribeiro (2009) tenha observado a ocorrência de necrose no fígado de linguados expostos ao TBT, não foi observada correlação entre esse parâmetro e a concentração de TBT em *C. spixii*. Também podemos observar através dos resultados obtidos, que a necrose esteve negativamente relacionada aos parâmetros biométricos, indicando que essa lesão possa ocorrer em indivíduos mais novos, mais sensíveis à exposição a contaminantes. Da mesma forma, esses parâmetros biométricos estiveram correlacionados com as enzimas de biotransformação, sendo estas inibidas em organismos considerados menores e menos pesados. De acordo com Mela et al. (2007), no fígado dos peixes, a presença de áreas necróticas está relacionada a concentração de

xenobióticos durante o processo de detoxificação. Também podem estar relacionadas a presença de infiltrações leucocitárias e a presença de parasitas (SILVA, 2010), tais como o observado no presente estudo.

Os CMMs podem se desenvolver em associação às lesões inflamatórias crônicas sendo análogos primitivos de centros germinativos de linfonodos, sendo mais frequentes em organismos mais velhos ou sobre maior estresse ambiental (AGIUS e ROBERTS, 2003; KIRON, 2012). Como previamente discutido, a Baía de Paranaguá vem apresentando uma contaminação por BTs em todos os compartimentos ambientais. Dessa forma, a presença de CMM associados às concentrações de TBT (principalmente relacionadas ao ponto A) podem ser resultantes desta exposição crônica discutida no presente trabalho. No entanto, vale ressaltar que a presença destas estruturas no fígado desses peixes indica uma exposição indesejada, embora também indique que o sistema de defesa desses organismos está em funcionamento e respondendo a essa exposição (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; RABITTO et al., 2005).

Para o DBT, houve uma correlação moderadamente significativa em relação aos dados do ensaio cometa de fígado (0,34) assim como as correlações fortemente significativas encontradas para os Σ HPAs (0,86). Dentre os BTs, a maior genotoxicidade já foi atribuída ao DBT (MĪCĪC et al., 2002), o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, sendo os maiores danos observados nos tecidos referentes ao ponto B onde foi observada a presença deste produto de degradação. Além disso, como mencionado na seção 5.5, o DBT pode ser muitas vezes considerado mais tóxico que o TBT no nível celular, como reportado por Oliveira Ribeiro et al. (2009) em linguados expostos a esse composto.

O'Halloran et al. (1998) também encontrou um potencial imunotóxico maior para o DBT do que para o TBT na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposto a concentrações de 50 ng g⁻¹. De acordo com o autor, os BTs possuem efeitos funcionais e tecido específicos no sistema imune de peixes em concentrações ambientais relevantes. No entanto, no presente estudo, este composto não esteve correlacionado com a ocorrência de respostas inflamatórias ou a presença de melanomacrófagos.

Os HPAs, distribuídos ao longo da Baía de Paranaguá em decorrência do grande tráfego de embarcações e vazamentos provenientes das atividades náuticas da região (KATSUMITI et al., 2009), não apresentaram correlação com as enzimas mensuradas ou as alterações histopatológicas, assim como o observado por Dabrowska et al. (2012). Entretanto, foi observada uma correlação fortemente significativa em

relação aos dados de cometa do fígado e esses contaminantes. Esse fato pode estar relacionado a maior ocorrência de HPAs de 2 anéis na bile, representados pelo naftaleno. Ramsdorf (2011) observou um aumento da incidência de danos ao DNA avaliados a partir do ensaio cometa em jundiás expostos à concentração de 3mg L^{-1} de naftaleno. Já para TBT não houve correlação com este biomarcador. De acordo com Rank (2009), a ocorrência de imposex (relacionadas à exposição ao TBT) no molusco *Litorina litorea* não esteve correlacionada à incidência de danos ao DNA quantificados através do ensaio cometa.

Além da análise de Spearman, o uso da análise de componentes principais (PCA) (Figura IV.11) também apresenta uma segregação entre as amostras do ponto A e B, excetuando-se a amostra 4A, onde foi observada uma das menores concentrações de TBT (62ng g^{-1}) e a maior e o maior atividade enzimática da EROD ($17\text{pmol.min}^{-1}.\text{mgproteína}^{-1}$). A matriz de correlação está presente no Apêndice 7.

A análise multivariada do PCA utilizando o fator 1 pelo fator 2 agrupa os dados de TBT com a incidência de CMMs, tal como previamente discutido. Da mesma forma, agrupa a maioria das amostras referentes ao ponto B aos maiores organismos, maior atividade da EROD e GST e presença dos maiores Σ HPAs e ocorrência de dano ao DNA.

Figura IV.11. Análise de componentes principais envolvendo biomarcadores e concentrações de BTs no bagre *C. spixii* amostrado em Paranaguá-PR.

Medições integradas de contaminantes e utilização e biomarcadores contribuem para a avaliação da saúde de um ecossistema através de relações indicativas de efeitos biológicos dos contaminantes (DABROWSKA et al., 2012). A segregação

dos pontos amostrais, encontrada a partir do PCA, pode indicar que os bagres *C. spixii* presentes nos dois pontos amostrais estão impactados pela presença de BTs neste estuário de maneira significativa.

A correlação do TBT com a EROD foi um importante parâmetro investigado e demonstrou que o bagre *C. spixii* pode ser utilizado em estudos de biomonitoramento para a investigação destes compostos em decorrência de sua resposta biológica evidenciada. Em outros estudos envolvendo o mesmo tratamento estatístico, esta enzima não esteve correlacionada com outros contaminantes orgânicos tais como HPAs e PCBs, investigados no músculo de *Leusciscus cephalus* na República Tcheca (HAVELKOVÁ et al., 2008). A utilização do fígado para a avaliação de todos os biomarcadores também foi importante para que fosse possível a correlação entre as concentrações de BTs detectadas, uma vez que a susceptibilidade de cada órgão é determinada pela diferente predisposição de acumular xenobióticos assim como diferentes taxas metabólicas e capacidade de defesa (OLIVEIRA et al., 2009).

Em *C. spixii* estudos conjugados de biomarcadores e quantificação de metais foi realizado por Azevedo et al. (2009) nos estuários de Cananéia e Santos/São Vicente demonstrando que o comprimento total esteve correlacionado com os biomarcadores metalotioneína (MT) e ácido delta aminolevulínico desidratase (ALAD). Katsumiti et al. (2009), ao utilizar *C. spixii* como biomonitor no vazamento de óleo ocasionado pelo navio Vicuña em Paranaguá utilizou marcadores genéticos, enzimáticos e histopatológicos. Entretanto, em virtude da contaminação crônica, apontada pelo autor, muitos desses biomarcadores não tiveram diferenças significativas entre os peixes amostrados antes e após o derramamento.

Embora em alguns casos seja possível uma correlação dos efeitos biológicos observados em organismos expostos a determinados contaminantes, existe uma grande dificuldade na precisão dos resultados. Flammarion et al. (2002) aponta para essas dificuldades uma vez que não observou correlações entre os parâmetros analisados.

No entanto, estudos do mecanismo de ação ou estudos de campo podem revelar efeitos reprodutivos em baixas concentrações do que as respostas obtidas através da realização de bioensaios contendo concentrações muito acima daquelas encontradas no ambiente (MORTENSEN e ARUKWE, 2007). Isso pode ser observado a partir da inibição da atividade da EROD observada na região do Porto de Paranaguá que, além de possuir o 3º maior Porto da América Latina ainda conta com a entrada de BTs a partir de

efluentes urbanos e industriais que chegam à região, sendo a contaminação por BTs considerada crônica em virtude dos resultados obtidos desde 2006 para estes compostos.

Os níveis de TBT e DBT encontrados podem ser considerados elevados e mostraram contribuição nos efeitos biológicos observados para *C. spixii*. Na Figura IV.12 estão presentes alguns dos efeitos tóxicos atribuídos ao TBT em bioensaios envolvendo peixes mediante as concentrações desse composto detectado em *C. spixii* no estuário de Paranaguá-PR. Além de seus efeitos diretos sobre a biota, a presença de TBT nos tecidos desses organismos implica na inibição do processo de detoxificação deste composto assim como demais poluentes presentes no sistema, acentuando a toxicidade de diversas maneiras (FENT e STEGEMAN, 1993).

Figura IV.12. Efeitos tóxicos atribuídos ao TBT em peixes (bioensaios) mediante as concentrações desse composto detectado em *C. spixii*: A. Redução do número de espermatozoides em *Scophthalmus maximus* com 25 ng g⁻¹ (GOSZ et al., 2011b); B. necrose e vacuolização em *Hippoglossoides platessoides* com 30 ng g⁻¹ (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2009); C. LOAEL com 40 ng g⁻¹ (WHO, 1990); D. degeneração nuclear de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* com 68 ng g⁻¹ (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002); E. necrose em *Hoplias malabaricus* com 300 ng g⁻¹ (RABITTO et al., 2005).

Assim, mediante os resultados obtidos, pode ser dizer que as concentrações de BTs encontradas neste estudo são consideradas tóxicas para a espécie *C. spixii* sendo desta forma, preocupantes. Embora os danos no fígado deste organismo não sejam

atribuídos apenas a esse composto, mas também grandemente influenciados pela presença de diversos contaminantes no sistema, os BTs podem estar contribuindo para a atenuação desses efeitos tóxicos, principalmente aqueles relacionados ao sistema de biotransformação.

Vale ressaltar que o presente estudo verificou a concentração e os efeitos biológicos sobre o fígado desses organismos amostrados em apenas uma coleta, realizada no período de inverno. Dessa forma, os resultados obtidos refletem a situação encontrada apenas no momento da amostragem, não sendo possível extrapolar esses resultados para outros períodos, espécies ou locais de estudo, servindo apenas como base para estudos futuros sobre a contaminação destes compostos em sistemas estuarinos.

As exposições prolongadas (crônicas) e severas (agudas) tais como as observadas para esse sistema estuarino, podem induzir a uma sequência de modificações funcionais e estruturais que podem comprometer as funções vitais dos peixes (CHOVANEK et al., 2003). O comprometimento da saúde desses organismos afeta, dessa forma, a ecologia desse sistema uma vez que esses peixes são considerados importantes elos da cadeia trófica estuarina além de constantes fontes de proteína para a comunidade ribeirinha.

6. Considerações do Capítulo IV

Foram detectadas concentrações significativas de BTs no fígado do bagre estuarino *Cathorops spixii* amostrado em Paranaguá-PR, indicando que estes contaminantes permanecem biodisponibilizados para a biota estuarina mesmo após a supressão de seu principal aporte (tintas anti-incrustantes) desde 2008. Os resultados encontrados podem ser consequência do processo de remobilização dos sedimentos ocasionados pela dragagem realizada no início de 2011 e que pode ter colocado em exposição concentrações de TBT antes fortemente preservadas em sedimentos anóxicos e proveniente de uma entrada antiga. As maiores concentrações foram observadas para o ponto A (referente ao Porto de Paranaguá), assim como o esperado, embora os peixes amostrados no ponto B também tenham apresentado concentrações mesmo que inferiores deste composto.

A presença de elevadas concentrações de TBT no fígado dos peixes amostrados no ponto A esteve significativamente relacionada a redução do CYP450, mensurado através da atividade enzimática da EROD, o que justifica a ausência de produtos de degradação nesses tecidos em decorrência da inibição da biotransformação do TBT. Já no ponto B, a presença de menores concentrações de TBT não são suficientes para a inibição do metabolismo, de acordo com a literatura. Assim, o funcionamento do sistema metabólico pode também estar correlacionado com as maiores concentrações de HPAs na bile observadas para este ponto, mesmo estando mais distante da região considerada como “HotSpot” da entrada de contaminantes (Porto) nesse sistema estuarino. Para GST, apesar de a maior atividade ser reportada também ao ponto B, essa correlação não se mostrou tão evidente.

No ponto A (Porto) foi evidenciada uma maior incidência de melanomacrófagos que pode estar relacionada às maiores concentrações de TBT uma vez que esse biomarcador já esteve associado à exposição a esse contaminante na literatura assim como a maior incidência de necrose. No entanto, nessa região existem diversos outros contaminantes que podem estar influenciando neste resultado, não sendo um biomarcador específico.

O dano ao DNA, evidenciado através do ensaio cometa, foi significativamente superior no ponto B onde foram detectadas maiores concentrações de HPAs assim como observada a presença de DBT, contaminantes associados a esse tipo de lesão. A

ocorrência de hiperóxidos, capazes de desencadear o dano ao DNA, foi semelhante entre os dois pontos amostrados, entretanto foi superior no ponto A.

De uma maneira geral, através do uso de biomarcadores no fígado do bagre *C. spixii* verifica-se que estes organismos encontram-se sob impacto na Baía de Paranaguá, apresentando lesões morfológicas e estruturais danosas à sua sobrevivência e reprodução, demonstrando uma contaminação crônica e difundida entre gradientes de contaminação. A quantificação de BTs nos tecidos desses peixes esteve correlacionada com alguns parâmetros biológicos observados, entretanto, os resultados devem ser tratados com bastante cautela uma vez que estão expostos a uma diversidade de outros agentes tóxicos presentes nesse sistema estuarino.

Conclusões gerais e perspectivas futuras

Do ponto de vista analítico, o método proposto para a análise de BTs em tecidos (brânquias e fígado) de bagres estuarinos foi avaliado quanto aos parâmetros de confiabilidade analítica, demonstrando que é adequado ao estudo desenvolvido. Destaca-se que o efeito matriz é de grande importância nestas determinações quando utilizada a quantificação por GC-PFPD. O mesmo efeito não foi constatado para sedimento e material particulado em suspensão.

A ocorrência de compostos butílicos de estanho esteve associada a todos os compartimentos ambientais analisados assim como detectada nos tecidos das três espécies de bagres estuarinos, indicando a existência do risco ambiental associado à presença destes compostos nos estuários. Os bagres estuarinos investigados podem ser considerados como biomonitores da presença de BTs em sistemas estuarinos uma vez que são capazes de fornecer informações sobre a ocorrência desses compostos no sistema como um todo, devido ao seu deslocamento ao longo dos estuários, entrando em contato com fontes potenciais de contaminação.

Foi observada a importância da inclusão do material particulado em suspensão (MPS) em estudos de monitoramento ambiental de BTs, uma vez que as concentrações neste material estiveram relacionadas a presença de BTs nos tecidos dos peixes, mesmo em locais onde a concentração destes compostos nos sedimentos esteve abaixo do limite de detecção. Dentre os tecidos, o fígado demonstrou uma maior resposta à assimilação destes compostos nesses ambientes.

Os efeitos negativos dos BTs sobre a biota aquática puderam ser observados através do uso de biomarcadores no fígado de *C. spixii* amostrado em Paranaguá-PR. Apesar dos resultados não estarem diretamente relacionados ao TBT e seus produtos de degradação, através da comparação entre as duas áreas amostradas pode-se correlacionar as respostas fisiológicas obtidas com as concentrações destes compostos, indicando a importância de estudos de biomonitoramento realizados em campo associados à presença de contaminantes específicos.

Apartir dos resultados integrados foi verificada a importância da utilização de organismos biomonitores para a avaliação do impacto de compostos butílicos de estanho em sistemas estuarinos, sendo que a presença destes contaminantes, mesmo em baixas concentrações, podem trazer consequências danosas a saúde dos organismos

expostos, abalando o equilíbrio desses sistemas e afetando de maneira direta e indiretamente populações que dependem desses recursos para a sua subsistência.

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os BTs permanecem detectados em sistemas estuarinos brasileiros, envolvendo diversas matrizes ambientais, onde o risco ecotoxicológico para a biota associada encontra-se presente. A partir desses resultados, acredita-se na necessidade de estudos mais detalhados envolvendo estes compostos, considerando-se os diversos níveis tróficos envolvidos e as diferentes rotas de exposição a esses contaminantes e mesmo em regiões distantes das principais fontes, uma vez que o transporte é possível através do material particulado em suspensão. O monitoramento espacial, contendo um número maior de pontos amostrais envolvendo um estudo mais detalhado de um sistema estuarino também poderá fornecer informações importantes para o comportamento dos BTs nos sistemas estuarinos. Esse procedimento, associado ao monitoramento também temporal em uma mesma área será de grande valia para o conhecimento científico relacionado ao comportamento e persistência dos BTs no ambiente aquático.

Estudos futuros no Brasil podem vir a abordar a presença de BTs também no músculo de peixes, uma vez que esse tecido compõe a principal rota de exposição humana a esses compostos, principalmente no que se refere a populações ribeirinhas. Diferentes espécies, pertencentes a diferentes guildas estuarinas também poderão ser testadas, auxiliando na interpretação da rota de exposição dos organismos. Testes adicionais envolvendo estudos de efeito matriz também são necessários em todas as matrizes para garantir a confiabilidade dos resultados gerados. A remoção dos interferentes poderá ser testada a partir do uso de espectrometria de massas (GC/MS) ou ainda a partir do uso de uma etapa de dessulfurização das amostras que pode incluir o uso de SPE e QUEChers.

A inserção de níveis permissíveis de TBT na disposição de sedimentos provenientes de dragagem (CONAMA 444/04) foi um grande passo conquistado em 2012. Entretanto, a legislação ainda permanece pendente de aprovação pelo poder executivo e os níveis determinados, como o observado neste estudo, são capazes de desencadear diversos efeitos toxicológicos na biota aquática. Por outro lado, a substituição do tributilestano em sistemas anti-incrustantes por outros compostos de toxicidade igual ou ainda superior, faz com que a preocupação ambiental envolvendo o uso dessas formulações permaneça constante. Além disso, enquanto não houver uma

fiscalização eficiente das atividades náuticas, o ambiente estuarino permanecerá sobre grande risco ecológico.

Referências

- ABALOS, M.; BAYONA, J.M.; COMPANÓ, R.; GRANADOS, M.; LEAL, C.; PRAT, M.D. Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review. **Journal of Chromatography A**, v.788, p.1-49, 1997.
- ABSOLON, B.A.; ANDREATA, J.V. Variação espacial dos bagres (Siluriformes, Ariidae) coletados na Baía da Ribeira, Angra dos Reis, Rio de Janeiro e prováveis influências da temperatura e da salinidade. **Revista de Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.2, p.155-165, 2009.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Disease**, v.26, p. 499-509, 2003.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaption to phagocyte-induced damage in *Anguilla Anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.290-302, 2004.
- AIRAKSIEN, R.; RANTAKOKKO, P.; TURUNRN, A.W.; VARTIAINEN, T.; VUORINEN, P.J.; LAPPALAINEN, A.; VIHERVUORI, A.; MANNIO, J.; HALLIKAINEN, A. Organotin intake through fish consumption in Finland. **Environmental Research**, v.110, p.544-547, 2010.
- ALBERGARIA BARBOSA, A.C.R. **Avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) na Baía de Santos através de metabólitos biliares**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- AL-GHAIS, S.M.; ALI, B. Inhibition of glutathione S-transferase catalyzed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.62, p.207-213, 1999.
- AL-RASHDI, A.A. **Improving the measurements of butyltin compounds in environmental samples**. 2011. 190f. Thesis (Doctor in Philosophy) - University of Southampton.
- ALTENBURGER, R.; SCHMITT-JANSEN, M. Predicting toxic effects of contaminants in ecosystems using single species investigations. In: MARKERT, B.A., BREURE, A.M., ZECHMEISTER, H.G (Eds). **Bioindicators and**

- Biomonitors:** Principles, concepts and applications. Amsterdam: Elsevier, 2003, 1017p.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, É.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.67, p.82-88, 2007.
- ALZIEU, C. Biological effects of tributyltin on marine organisms. In: DE MORA, S.J. (Ed). **Tributyltin**: case study of an environmental contaminant. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. P.167-211. (Cambridge Environmental Series, v.8).
- AMADO, L.L.; ROSA, C.E.; LEITE, A.M.; MORAES, L.; PIRES, W.V.; PINHO, G.L.L.; MARTINS, C.M.G.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v.52, p.199-206, 2006.
- AMINI, F.L.; BADII, K.; RASTKARI, N.; GERAYESHNEJAD, M. Trace analysis of tributyltin chloride in fish tissue by electron capture gas chromatography. **Indian Journal of Geo-marine Sciences**, v.41, n.1, p.40-44, 2012.
- AMIRAV, A.; JING, H. Pulsed flame photometric detector for gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v.67, p.3305-3318, 1995.
- ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. **Aquatic Toxicology**, v.24, p.1-20, 1992.
- ANDREATA, J.V.; BARBIERI, L.R.R.; SEBILIA, A.S.B.; SILVA, M.H.C.; SANTOS, R.P. A list of Marapendi Lagoon fishes, Rio de Janeiro, Brazil. **Atlântica**, v.11, p. 5-17, 1989.
- ANJOS, V.E. **Especiação de cobre e arsênio no Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá**. 2006. 175f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná.
- ANTIZAR-LADISLAO, B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**, v.34, p. 292-308, 2008.

- ARAÚJO, F.G. Distribuição, abundância relativa e movimentos sazonais de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos (RS), Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, n.4, p.509-543, 1988.
- ARAÚJO, F.G.; AZEVEDO, M.C.C.; SILVA, M.A.S.; PESSANHA, A.L.M.; GOMES, I.D.; CRUZ-FILHO, A.G. Environmental influences on the demersal fish assemblages in the Sepetiba Bay, Brazil. **Estuaries**, v.25, n.3, p.441-450, 2002.
- ARRUDA, N.C.L.P.; CORBISIER, T.N. **Biologia populacional de *Hastula cinerea* (Born, 1778) (Gastropoda: Terebridae) na Praia do Una, Litoral Sul do Estado de São Paulo**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 16, 2008, São Paulo. Resumos...São Paulo: USP, 2008.
- AZEVEDO, J.S.; FERNANDEZ, W.S.; FARIAS, L.A.; FAVARO, D.T.I.; BRAGA, E.S. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. **Ecotoxicology**, v.18, n.5, p.577-586, 2009.
- AZEVEDO, J.S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; BRAGAM E.S.; FÁVARO, D.I.; BEBIANNO, M.J. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America. **Ecotoxicology**, v.18, p.1001-1010, 2009b.
- AZEVEDO, M.C.C.; ARAÚJO, F.G.; CRUZ FILHO, A.G.; SANTOS, A.C.A. Distribuição e abundância relativa de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.4, p.853-865, 1998.
- AZEVEDO, M.C.C.; ARAÚJO, F.G.; CRUZ-FILHO, A.G.; GOMES, I.D.; PESSANHA, A.L.M. Variação espacial e temporal de bagres marinhos(Siluriformes, Ariidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.3, p. 443-454, 1999.
- BACON-MONTIGNY, C.; LESPES, G.; POTIN-GAUTIER, M. Improved routine speciation of organotin compounds in environmental samples by pulsed flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.896, p.149-158, 2000.
- BARBIERI, L.R.; SANTOS, R.P.; ANDREATA, J.V. Reproductive biology of the marine catfish, *Genidens genidens* (Siluriformes, Ariidae), in the Jacarepaguá Lagoon system, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v.35, p.23-35, 1992.

- BARBIERI, L.R.R.; ANDREATA, J.V.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.H.C.; SEBILIA, A.S.C.; SANTOS, R.P. Distribuição e ciclo de vida das espécies de peixes mais abundantes da laguna de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.7, n.3, p.223-243, 1991.
- BARBOSA, S.C.T. **Mercúrio Total em *Cathorops spixii* Agassiz, 1829 (Actinopterygii-Ariidae) no estuário do Rio Goiana: variações espaciais e sazonais**. 2010. 35f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco.
- BARCELLOS, C. **Geodinâmica de Cádmio e Zinco na Baía de Sepetiba**. 1995. 147f. Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense.
- BARCELLOS, C.; LACERDA, L.D.; CERADINI, S. Sediment origin and budget in Sepetiba Bay (Brazil) – an approach based on multielemental analysis. **Environmental Geology**, v.32, n.3, p.203-209, 1997.
- BARLETTA, M.; AMARAL, C.S.; CORRÊA, M.F.M.; GUEBERT, F.; DANTAS, D.V.; LORENZI, L.; SAINT-PAUL, U. Factors affecting seasonal variations in demersal fish assemblages at an ecocline in a tropical-subtropical estuary. **Journal of Fish Biology**, v.73, p.1314-1336, 2008.
- BARRA, R.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; ORREGO, R.; PARRA, O.; GAVILAN, J.F. Bioavailability of PAHs in the Biobio river (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. **Chemosphere**, v.45, p.439-444, 2001.
- BARTOLOMÉ, L.; ETXEBARRIA, N.; MARTÍNEZ-ARKARAZO, I.; RAPOSO, J.C.; USOBIAGA, A.; ZULOAGA, O.; RAINGEARD, D.; CAJARAVILLE, M.P. Distribution of organic microcontaminants, butyltins and metals in mussels from the estuary of Bilbao. **Archives in Environmental Contamination and Toxicology**, v.59, p.244-254, 2010.
- BEN AMEUR, W.; LAPUENTE, J.; MEGDICHE, Y.; BARHOUMI, B.; TRABELSI, S.; CAMPS, L.; SERRET, J.; RAMOS-LÓPEZ, D.; GONZALEZ-LINARES, J.; DRISS, M.R.; BORRÀS, M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). **Marine Pollution Bulletin**, v.64, p.241-251, 2012.
- BERG, M.; ARNOLD, C.G.; MULLER, S.R.; MUHLEMANN, J.; SCHWARZENBACH, R.P. Sorption and desorption behavior of organotin

- compounds in sediment-pore water systems. **Environmental Science and Technology**, v.35, p.3151-3157, 2001.
- BÉRGAMO, A.L. **Características da hidrografia, circulação e transporte de sal: Barra de Cananéia, Sul do Mar de Cananéia e Baía do Trapandé**. 200. 254f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, p.25-34, 1999.
- BERTO, D.; GIANI, M.; BOSCOLO, R.; COVELLI, S.; GIOVANARDI, O.; MASSIRONI, M.; GRASSIA, L. Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). **Marine Pollution Bulletin**, v.55, p.425-435, 2007.
- BETANCUR-R, R.; ACERO, A.P.; BERMINGHAM, E.; COOKE, R. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.45, p.339-357, 2007.
- BHOSLE, N.B.; GARG, A.; JADHAV, S.; HARJEE, R.; SAWANT, S. S.; VENKAT, K.; ANIL, A.C. Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. **Chemosphere**, v.57, p.897-907, 2004.
- BIANCHI, T.S. **Biogeochemistry of Estuaries**, Oxford University Press, 2006, 720p.
- BIGARELLA, J.J. Problemas de assoreamento na Baía de Paranaguá (PR). In: BOLDRINI, E.B., SOARES, C.R., PAULA, E.V. (Orgs). **Dragagens Portuárias no Brasil: Licenciamento e Monitoramento Ambiental**. Antonina: UNIBEM, 2007. P.136-146.
- BIGGATI, G.; PRIMOST, M.A.; CLEDÓN, M.; AVERBUJ, A.; THEOBALD, N.; GERWINSKI, W.; ARNTZ, W.; MORRICONI, E.; PENCHASZADEH, P.E. Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.695-701, 2009.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no ambiente: Efeitos e Consequências. **Química Nova**, v.30, n.3, p.651-666, 2007.

- BLUNDEN, S. J.; EVANS, C. J. Organotin compounds In: HUTZINGER, O (Ed) **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin: Springer-Verlog, 1990, p.1-44.
- BORDIGNON, N.; GODDHOSI, S. **Análise de processos associados à dinâmica fluvial**. In: COMITÊ ITAJAÍ. <<http://www.comiteitjai.org.br>>. Acesso em 20 de Maio de 2012.
- BORGHI, V.; PORTE, C. Organotin pollution in deep-sea fish from Northwestern Mediterranean. **Environmental Science and Technology**, v.36, p.4224-4228, 2002.
- BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 18 de maio de 2012.
- BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Área de Proteção Ambiental Cananéia-Iguape-Peruíbe**. 2012a Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/apacip>>. Acesso em 1 de junho de 2012.
- BRASIL. Programa de Aceleração do Crescimento (PAC). **Portos Marítimos**. 2012b. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/pac>>. Acesso em 18 de Maio de 2012.
- BRAVO, M.; VALENZUELA, A.; QUIROZ, W.; PINTO, M.; FLORES, M.; PINOCHET, H. Development of a simple desulfurization procedure for the determination of butyltins in complex sediment samples using gas chromatography-pulsed flame photometric detection. **Talanta**, v.81, p.1034-1039, 2010.
- BROOKE, L.T.; CALL, D.J.; POIRER, S.H.; MARKEE, T.P.; LINDBERG, C.A.; MCCAULEY, D.J.; SIMONSON, P.G. **Acute toxicity and chronic effects of bis (tri-n-butyltin) oxide to several species of freshwater organisms**. Center for Lake Superior Environmental Studies, university of Wisconsin, Superior, WI.20p, 1986.
- BRÜSCHWEILER, B.J.; WÜRGLER, F.E.; FENT, K. An ELISA assay for cytochrome P450 in fish liver cells. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.15, p.592-596, 1996.
- BUCK-KOEHNTOP, B.A.; PORCELLI, F.; LEWIN, J.L.; CRAMER, C.J.; VEGLIA, G. Biological chemistry of organotin compounds: Interactions and dealkylation by dithiols. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 692, p. 1748-1755, 2006.

- BUHLER, D.R.; WILLIAMS, D.E. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v.11, p.19-28, 1988.
- BURTON, E.D.; PHILLIPS, I.R.; HAWKER, D.W. Sorption and desorption behavior of tributyltin with natural sediments. **Environmental Science and Technology**, v.38, p. 6694-6700, 2004.
- BURUAEM, L.M.; HORTELLANI, M.A.; SARKIS, J.E.; COSTA-LOTUFO, L.V.C.; ABESSA, D.M.S. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.64, p.479-488, 2012.
- CALLARD, G.V.; TCHOUDAKOVA, A.V.; KISHIDA, M.; WOOD, E. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of CYP19 genes in teleost fish. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.79, p.305-314, 2001.
- CAMILO, E.; QUADROS, J.; CASTRO, I.B.; FERNANDEZ, M. Imposex in *Thais rustica* (Mollusca: Neogastropoda) (Lamark, 1822) as an indicator of organotin compounds pollution at Maceio coast (Northeastern Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v.52, n.2, p.101-105, 2004.
- CAMPLILLO, N.; AGUINAGA, N.; VIÑAS, P.; LÓPEZ- GARCIA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Speciation of organotin compounds in waters and marine sediments using purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection. **Analytica Chimica Acta**, v.525, p.273-280, 2004.
- CARDOSO, M.H.W.M.; NOBREGA, A.W.; ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. **Revista Analytica**, v.34, p.48-55, 2008.
- CARDOSO, R.S.; CAETANO, C.H.S.; CABRINI, T.B.M. Biphallia in imposed females of marine gastropods: new record for *Nassarius vibex* from Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.1, p.223-224, 2009.
- CARVALHO, P.N.; RODRIGUES, P.N.R.; BASTO, M.C.P.; VASCONCELOS, M.T.S.D. Butyltin levels in several Portuguese coastal áreas. **Environmental Monitoring Assessment**, v.159, p.183-190, 2009.
- CASSI, R.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; DE MORA, S. Organotin speciation analyses in marine biota using sodium tetraethylborate ethylation and gas chromatography with flame photometric detection. **Applied Organometallic Chemistry**, v.16, p.355-359, 2002.

- CASTRO, I.B.; BRAGA, A.R.C.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca:Gastropoda) em áreas portuárias dos Estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. **Tropical Oceanography**, v.33, n.2, p.121–128, 2005.
- CASTRO, I.B.; CASCON, H.M.;FERNANDEZ, M.A. Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da contaminação por organoestânicos na costa do Município de Fortaleza - Ceará - Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.33, p.143-148, 2000.
- CASTRO, I.B.; MEIRELLES, C.A.O.; CASCON-MATTHEWS, H.;FERNANDEZ, M.A. *Thais (Stramonita) rustica* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Thaididae), a potential bioindicator of contamination by organotin northeast Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.52, n.2, p.135-139, 2004.
- CASTRO, I.B.; RIBEIRO-FERREIRA, V.P.; LIMA, A.F.A.; MEIRELLES, C.A.O.; ROCHA-BARREIRO, C.A. Imposex in three prosobranch species from Ilha do Japonês, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. **Thalassas**, v.23, n.2, p.37-42, 2007.
- CASTRO, I.B.; ROSSATO, M.; FILLMANN, G. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.31, n.5, p.947-954, 2012.
- CESAN. Companhia Espírito Santense de Saneamento 2012. **Bacia do Rio Itapemirim**. Disponível em: <http://www.seculodiario.com.br/cesan/bacia_itapemirim.doc>. Acesso em 18 de Maio de 2012.
- CEULEMANS, M.; SLAETS, S.; ADAMS, F. Speciation of organotin in environmental sediment samples. **Talanta**, v.46, p.395-405, 1998.
- CHAE, Y.; HOULF, W.G.; MCDANIEL, A.H.; TROUP, J.; ALLENDORF, M.D. Stagnation flow reactor investigation of tin oxide CVD from monobutyltin trichloride. **Journal of the Electrochemical Society**, v.151, n.8, p.527-534, 2004.
- CHAMP, M.A.; SELIGMAN, P.F. **Organotin: environmental fate and effects**. Chapman and Hall, London, first edition, 1996, 629p.
- CHAU, Y.K.; YANG, F.; BROWN, M. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. **Analytica Chimica Acta**, v.338, p.51-55, 1996.
- CHAVES, P.T.; COVA-GRANDO, G.; CALLUF, C. Demersal ichthyofauna in continental shelf region on the south coast of Brazil exposed to shrimp trawl fisheries. **Acta Biológica Paranaense**, v.32, p.69-82, 2003.

- CHOI, M.; CHOI, H.G.; MOON, H.B.; KIM, G.Y. Spatial and temporal distribution of tributyltin (TBT) in seawater, sediments and bivalves from coastal areas of Korea during 2001-2005. **Environmental Monitoring Assessment**, v.151, p.301-310, 2009
- CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A., BREURE, A.M., ZECHMEISTER, H.G. (Eds). In: **Bioindicators and Biomonitoring – Principles, concepts and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2003, p.639-676.
- CIESIELSKI, T.; WASIK, A.; KUKLIK, I.; SKÓRA, K.; NAMIESNIK, J.; SZEFER, P. Organotin compounds in the liver tissue of marine mammals from the Polish coast of the Baltic Sea. **Environmental Science Technology**, v.38, p.1415-1420, 2004.
- CLEMENTE, Z. **Monitoramento do reservatório Alagados, Ponta Grossa (PR) através de biomarcadores e análise de cianotoxinas**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná.
- CODESA. Companhia Docas do Espírito Santo. **Porto de Vitória**. 2012. Disponível em: <<http://www.portodevitoria.com.br>>. Acesso em 18 de Maio de 2012.
- COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research**, v.681, p.24-32, 2009.
- CONORATH, D.G.; MAZZER, A.M.; LORENZI, L.; BECKER, F.; NASS, D.H. **Variação sazonal dos sedimentos de fundo na Baía da Babitonga em um transecto próximo à Ilha da Rita-São Francisco do Sul, Santa Catarina**. ENCONTRO NACIONAL DOS GEÓGRAFOS, 16., 2010, Porto Alegre. **Anais...**São Paulo: AGB, 2010, p.1-12.
- CORNELIESSEN, G.; PETTERSEN, A.; NESSE, E.; EEK, E.; HELLAND, A.; BREEDVELD, G.D. The contribution of urban runoff to organic contaminant levels in harbor sediments near two Norwegian cities. **Marine Pollution Bulletin**, v.56, p.565-573, 2008.
- CORRÊA, M.F.M. **Ictiofauna demersal da Baía de Guaraqueçaba (Paraná, Brasil). Composição, estrutura, distribuição espacial, variabilidade temporal e importância como recurso**. 2001. 171f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná.
- COSTA, M. B.; FERNANDEZ, M. A.; BARBIERO, D. V.; MELO, F. T. V.; OTEGUI, M. B. P.; FERREIRA, B. S. First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.56, n.2, p.145-148, 2008.

- COSTA, M.; BARLETTA, M.; SILVA, O.C.A. Fish species as indicators of chemical pollution in a tropical estuary. – In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE BIOLOGY OF FISH, 6., 2004, Manaus. **Proceedings...**[S.I.]: American Fisheries Society, 2004. P.241-249.
- COSTA, M.D.P. **Ictioplâncton da Baía da Babitonga (SC, Brasil): Instrumento para a definição de áreas prioritárias para a conservação.** 2011. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí.
- CREMER, M.J.; MORALES, P.R.D.; OLIVEIRA, T.M.N. **Diagnóstico ambiental da Baía da Babitonga.** Univille, Joinville, SC. 256p, 2006.
- CRISTALE, J.; SANTOS, D.M.; SANT'ANNA, B.S.; SANDRON, D.C.; SOUZA, S.C.; TURRA, A.; MARCHI, M.R.R. Tributyltin in crustacean tissues: analytical performance and Validation method. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.23, n.1, p.39-45, 2012.
- CRONIN, M.; MCGOVERN, E.; MCMAHON, T.; BOELEN, R. **Guidelines for the assessment of dredged material for disposal in Irish Waters.** Marine Environment and Health Series 24, 56p.
- CUNHA, C.L.N., ROSMAN, P.C.C., MONTEIRO, T.C.N. **Avaliação por esgoto sanitário na Baía de Sepetiba usando modelagem ambiental.** In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 28., Cancún, 2002. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales; AIDIS. Gestión inteligente de los recursos naturales: desarrollo y salud. México, D.F, FEMISCA, 2002. P.1-8.
- CUNHA, C.L.N.; ROSMAN, P.C.C.; MONTEIRO, T.C.N. **Caracterização da Circulação Hidrodinâmica Bidimensional da Baía de Sepetiba.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 14., 2001, Aracaju. **Resumos...**Aracaju: ABRH, 2001.
- CUNHA-LIGNON, M. **Dinâmica do manguezal no Sistema Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo-Brasil.** 2001. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- D'AGATI, P.; MANSUETO, C.; MANSUETO, V.; PELLERITO, C.; CANGIALOSI, M.V.; FIORE, T.; SCOPEÇÇITI, M.; PELLERITO, L. Effects of sublethal levels of tributyltin chloride on a new toxicity test organism, *Liza saliens* (Osteichthyes,

- Mugilidae): a histological study. **Applied Organometallic Chemistry**, v.20, p.357-367, 2006.
- DABROWSKA, H.; OSTASZEWSKA, T.; KAMASZEWSKI, M.; ANTONIAK, A.; NAPONA-RUTKOWSKI, L.; KOPKO, O.; LANG, T.; FRICKE, N.F.; LEHTONEN, K.K. Histopathological, histomorphometrical, and immunohistochemical biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.78, p.14-21, 2012.
- DAFFORN, K.A.; SIMPSON, S.L.; KELAHER, B.P.; CLARCK, G.F.; KOMYAKOVA, V.; WONG, C.K.C.; JOHNSTON, E. The challenge of choosing environmental indicators of anthropogenic impacts in estuaries. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 207-217, 2012.
- DANTAS, D.V.; BARLETTA, M.; COSTA, M.F.; BARBOSA-CINTRA, S.C.T.; POSSATO, F.E.; RAMOS, J.A.A.; LIMA, A.R.A.; SAINT-PAUL, U. Movement patterns of catfishes (Ariidae) in a tropical semi-arid estuary. **Journal of Fish Biology**, n.76, p.2540-2557, 2010.
- DAVIES, A.G. **Organotin Chemistry**. 2nd Ed. Weinheim: Wiley, 2004, 436p.
- DAVIES, A.G.; SMITH, P.J. Recent advances in organotin chemistry. **Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry**, v.23, p.1-77, 1980.
- DAY, J.W.J.; HALL, C.A.; KEMP, W.M.; YÁNEZ-ARANCIBA, A. **Estuarine ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1989, 558p.
- DE MORA, S. J.; FOWLER, S. W.; CASSI, R.; TOLOSA, I. Assessment of organotin contamination in marine sediments and biota from the Gulf and adjacent region. **Marine Pollution Bulletin**, v.46, p.401-409, 2003.
- DEPLEDGE, M.H.; AAGAARD, A.; GYORKOS, P. Using molecular, physiological and behavioral biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, p.19-27, 1995.
- DEVOS, C.; VLIEGEN, M.; WILLAERT, B.; DAVID, F.; MOENS, L.; SANDRA, P. Automated headspace-solid-phase micro extraction-retention time locked-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry for the analysis for organotin compounds in water and sediment samples. **Journal of Chromatography A**, v.1079, p.408-414, 2005.
- DÍEZ, S.; ÁBALOS, M.; BAYONA, J.M. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. **Water Research**, v.36, p.905-918, 2002.

- DÍEZ, S.; BAYONA, J.M. Butyltin occurrence and risk assessment in the sediments of the Iberian Peninsula. **Environmental Management**, v.90, p.25-30, 2009.
- DIRX, W.M.R.; LOBINSKI, R.; ADAMS, F.C. Speciation analysis of organotin in water and sediments by gas chromatography with optical spectrometric detection after extraction separation. **Analytica Chimica Acta**, v.286, p.309-318, 1994.
- DIXON, D.R.; WILSON, J.T. Genetics and marine pollution. **Hidrobiologia**, v.420, p.29-43, 2000.
- DOBSON, S.; HOWE, P.; FLOYD, P. **Mono and disubstituted methyltin, butyltin, and octyltin compounds**. World Health Organization. Geneva, 2006, 73p.
- DORNELES, P.R.; LAÍSON-BRITO, J.; FERNANDEZ, M.A.S.; VIDAL, L.G.; BARBOSA, L.A.; AZEVEDO, A.F.; FRAGOSO, A.B.L.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian eaters through hepatic total tin concentrations. **Environmental Pollution**, v.156, p.1268-1276, 2008.
- DYER, K.R. **Estuaries: A physical introduction**. New York: Wiley-Interscience, 1973, 140p.
- EC.European Commission. Commission decision of 28 May 2009 amending Council Directive 76/769/EEC as regards restrictions on the marketing and use of OTs for the purpose of adapting its Annex I to technical progress (2009/425/EC). **Official Journal of European Union**, 2009, 238p.
- EDBON, L.; HILL, S.J.; RIVAS, C. Organotin compounds in solid waste: a review of their properties and determination using high-performance liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v.17, n.5, p. 277-288, 1998.
- EIRAS-STOFELLA, D.R.; FANK-DE CARVALHO, S.M. Morphology of gills of the seawater fish *Cathorops spixii* (Agassiz) (Ariidae) by scanning and transmission electron microscopy. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.19, n.4, p.1215-1220, 2002.
- ELSKUS, A.A.; COLLIER, T.K.; MONOSSONT, E. Interactions between lipids and persistent organic pollutants in fish. In: MOMMSEN, T.P.AND MOON, T.W. (Eds) **Biochemistry and molecular biology of fishes**. Amsterdam: Elsevier, 2005, p. 119-152.
- ENCINAR, J.R.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; FERNANDÉZ, J.R.; GARCÍA, J.I.; DÍEZ, S.; BAYONA, J.M.; SANZ-MEDEL, A. Evaluation of accelerated solvent

- extraction for butyltin speciation in PACS-2 CRM using double spike isotope dilution GC/ICPMS. **Analytical Chemistry**, v.74, n.20, p.5237-5242, 2002.
- EURACHEM – **The fitness for purpose of Analytical Methods**. A laboratory guide to method validation and related topics. London: LGC,1998, 75p.
- EVANS, O.; KAUFFMAN, P.; VONDERHEIDE, A.P.; WYMER, L.J.; MORGAN, J.N. The determination of pesticidal and non pesticidal organotin compounds in water matrices by in situ ethylation and gas chromatography with pulsed flame photometric detection. **Microchemical Journal**, v.92, p.155-164, 2009.
- FAVARO, L.F.; FREHSE, F.A.; OLIVEIRA, R.N.; JUNIOR, R.S. Reprodução do bagre amarelo, *Cathorops spixii* (Agassiz) (Siluriformes, Ariidae), da Baía de Pinheiros, região estuarina do litoral do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.4, p.1022-1029, 2005.
- FELIZZOLA, J. F. **Especiação de Compostos Butílicos de Estanho em Sedimentos Superficiais da Baía de Todos os Santos**. 2005. 121f. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- FELIZZOLA, J.F.; WAGENER, A.L.R.; ALMEIDA, A.C.; LIN, W.O. Butyltin speciation in sediments from Todos os Santos bay (Bahia, Brazil) by GC-PFPD. **Química Nova**, v.31, p.89-93, 2008.
- FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, v. 140, p. 353-365, 2003.
- FENT, K. Effects of organotin compounds in fish: from the molecular to the population level. In: BRAUNBECK, T., HINTON, D.E., STREIT, B. (Eds). **Fish ecotoxicology**. Basel: Birkhauser Verlag, 1999. p.259-302.
- FENT, K.; HUNN, J. Uptake and elimination of tributyltin in fish yolk sac larvae. **Marine Environmental Research**, v.35, p.65-71, 1993.
- FENT, K.; LOOSER, P.W. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: influence of pH and humic acids. **Water Research**, v.29, n.7, p.1631-1637, 1994.
- FENT, K.; STEGEMAN, J.J. Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms on marine fish. **Aquatic Toxicology**, v.24, p.219-240, 1993.
- FENT, K.; WOODIN, B.; STEGEMAN, J.J. Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. **Comparative biochemistry and physiology Part C**, v.121, p.277-288, 1998.

- FERNANDEZ, M. A.; DE LUCA REBELLO WAGENER, A.; LIMAVERDE, A. M.; SCOFIELD, A. L.; PINHEIRO, F. M.; RODRIGUES, E. Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, v.59, p. 435-452, 2005.
- FERNANDEZ, M. A.; LIMAVERDE, A. M.; CASTRO, I. B.; ALMEIDA, A. C. M.; WAGENER, A. L. R. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.2, p.463-476, 2002.
- FERNANDEZ, M.A.; PINHEIRO, F.M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal of Environment and Health**, v.1, n.3, p.247-448, 2007.
- FERNANDEZ, W.S.; DIAS, J.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; AZEVEDO, J.S. Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidae) from two beaches in southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.59, n.2, p.163-169, 2011.
- FERNANDÉZ-ESCOBAR, I.; BAYONA, J.M. Supercritical fluid extraction of priority organotin contaminants from biological matrices. **Analytica Chimica Acta**, v.355, p.269-276, 1997.
- FERRARO, M.V.M.; FENOCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; CESTARI, M.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated of using the comet assay, piscine micronucleus and chromossome aberrations tests. **Genetic and molecular biology**, v.27, p.103-107, 2004.
- FIGUEIREDO, J.L.; MENEZES, N.A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II- teleostei** (1). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1978, 110p.
- FILIPKOWSKA, A.; KOWALEWSKA, G.; PAVONI, B.; LECZÚŃSKI, L. Organotin compounds in surface sediments from seaports on the Gulf of Gdansk (southern Baltic coast). **Environmental Monitoring Assessment**, v.182, p.455-466, 2011.

- FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; MIGEON, B.; NOURY, P.; GARRIC, J. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.145-153, 2002.
- FLORES, M.; BRAVO, M.; PINOCHET, H.; MAXWELL, P.; MESTER, Z. Tartaric acid extraction of organotin compounds from sediment samples. **Microchemical Journal**, v.98, p.129-134, 2011.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1956.
- FONSECA, V.F.; FRANÇA, S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; BEBIANO, M.J.; CABRAL, H.N. Multibiomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. **Aquatic Toxicology**, v.102, p.216-227, 2011.
- FORCELINI, H.C.D.L. **Depuração de ostras de cultivo da baía de Guaratuba-Paraná-Brasil**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.
- FOURNIE, J.W.; SUMMERS, J.K.; COURTNEY, L.A.; ENGLE, V.D.; BLAZER, V.S. Utility of splenic macrophage aggregates and an indicator of fish exposure to degraded environments. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.13, p.105-116, 2001.
- FROHENER, S.; MACENO, M.; MACHADO, K.S. Predicting bioaccumulation of PAHs in the trophic chain in the estuary region of Paranaguá, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.174, n.1, p.135-145, 2011.
- GABBIANELLI, R.; MORETTI, M.; CARPENE, E.; FALCONI, G. Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalvis*) erythrocytes assessed by the comet assay. **Science of the Total Environment**, v.367, p.163-169, 2006.
- GADD, G.M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **Science of the Total Environment**, v.258, p.119-127, 2000.
- GALLEGO-GALLEGOS, M.; GARRIDO, M.L.; OLIVAS, R.M.; BARAVALLE, P.; BAGGIANI, C.; CÁMARA, C. A new application of imprinted polymers: Speciation of organotin compounds. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.3400-3407, 2010.

- GALLEGO-GALLEGOS, M.; LIVIA, M.; OLIVAS, R.M.; CÁMARA, C. Focused ultrasound and molecularly imprinted polymers: a new approach to organotin analysis in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v.1114, p.82-88, 2006.
- GARG, A.; ANTÓN-MARTÍN, R.; GARCÍA-LUQUE, E.; RIBA, I.; DELVALLS, T.A. Distribution of butyltins (TBT, DBT, MBT) in sediments of Gulf of Cádiz (Spain) and its bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum*. **Ecotoxicology**, v.18, p.1029-1035, 2009.
- GENTEN F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Science publishers, Plymouth, 2009, 219p.
- GIANNINI, M.F.; COTTI, A.M.; HARARI, J. **Variabilidade espaço temporal do material em suspensão na Baía de Santos e áreas adjacentes com auxílio de imagens de satélite**. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 14., 2009. Natal. **Anais...**São José dos Campos: INPE: 2009. P.2033-2039.
- GIPPERT, L. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.86-95, 2009.
- GODOI, A.F.L. **Estudo sobre a ocorrência de compostos organoestânicos em sedimentos marinhos superficiais na costa do estado de São Paulo**. 2001. 152f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- GODOI, A.F.L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação Ambiental por Compostos Organoestânicos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.708-716, 2003a.
- GODOI, A.F.L.; MONTONE, R.C.; SANTIAGO-SILVA, M. Determination of butyltin compounds in surface sediments from the São Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography–pulsed flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.985, p.205–210, 2003b.
- GOKSOYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, v.22, p.287-312, 1992.
- GOMES, I.D.; ARAÚJO, F.G. Reproductive biology of marine catfishes (Siluriformes, Ariidae) in the Sepetiba bay, Brazil. **Revista Biologia Tropical**, v.52, n.1, p.143-156, 2004.
- GOMES, I.D.; ARAÚJO, F.G.; AZEVÊDO, M.C.C.; PESSANHA, A.L.M. Biologia reprodutiva dos badres marinhos *Genidens genidens* (Valenciennes) e *Cathorops*

- spixii* (Agassiz) (Siluriformes, Ariidae), na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p.171-180, 1999.
- GOMES, R.S. *Conus jaspideus* (Mollusca: Neogastropoda: Conoidea) on the Brazilian coast. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.91, p.531-538, 2010.
- GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K., RIBEIRO, L.R. (Eds). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.346-377.
- GOSZ, E.; HORBOWY, J.; RUCZUNSKA, W.; ZIETARA, M.S. Enzymatic activities in spermatozoa and butyltin concentrations in baltic turbot (*Scophthalmus maximus*). **Marine Environmental Research**, v.72, p.188-195, 2011.
- GRUN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R.; GARDINER, D.M.; KANNO, J.; IGUCHI, T.; BLUMBERG, B. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of Adipogenesis in Vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v.20, p.2141-2155, 2006.
- GUARDIOLA, F.A.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.1541-1560, 2012.
- GUÉRIN, T.; SIROT, V., VOLATIER, J.-L.; LEBLANE, J.C. Organotin levels in seafood and its implications for health risk in high-seafood consumers. **Science of the Total Environment**, v.388, p.66-77, 2007.
- GUILOSKI, I.C. **Estudos in vivo e in vitro dos efeitos de pesticidas em peixes nativos**. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná.
- HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUR, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v.800, p.283-295, 1998.
- HAMED, R.R.; FARID, N.M.; ELOWA, S.H.E.; ABALLA, A.M. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. **Environmentalist**, v.23, p.313-322, 2003.

- HANSEN, P.D. Biomarkers. In: MARKERT, B.A., BREURE, A.M., ZECHMEISTER, H.G. (Eds). **Bioindicadores and biomonitors**. Amsterdam: Elsevier, 2003, p.203-220.
- HARARI, J.; CAMARGO, R.; CACCIARI, P.L. Resultados da modelagem numérica hidrodinâmica em simulações tridimensionais das correntes de maré na baixada santista. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.5, n.2, p.71-87, 2000.
- HARINO, H.; ARIFIN, Z.; RUMENGANM F.M.; ARAI, T.; OHJI, M.; MIYAZAKI, N. Distribution of antifouling biocides and perfluoroalkyl compounds in sediments from selected locations in Indonesian Coastal Waters. **Archives in Environmental Contamination Toxicology**, v.63, n.1, p.13-21, 2012.
- HARINO, H.; O'HARA, S.C.M.; BURT, G.R.; POPE, N.D.; CHESMAN, B.S.; LANGSTON, W.J. Butyltin and phenyltin compounds in eels (*Anguilla anguilla*). **Journal of Marine Biology Assessment**, v.82, p.893-901, 2002.
- HARRIS, J.R.W.; CLEARY, J.J. Particle-water partitioning and the role of sediments as a sink and secondary source of TBT. In: CHAMP, M.A. E SELIGMAN, P.F (Eds). **Organotin: Environmental fate and effects**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1987, 629p.
- HARTL, M.G.J. Benthic fish as sentinel organisms of estuarine sediment toxicity. In: BRIGHT, M., DWORSCHAK, P.C., STACHOWITSCH, M. (Eds). **The Viena school of marine biology**: attribute to Jorg Ott. Facultas Universitätsverlag, Wien., 2000, p.89-100.
- HARTWELL, S.I.; JORDAN, S.J. **Effects of contaminants on fish and shellfish**. Disponível em: <<http://www.dnr.state.md.us>>. Acesso em 18 de Junho de 2012.
- HAUBRUGE, E.; PETIT, F.; GAGE, M.J.G. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 267, n.1459, p.2333-2337, 2000.
- HAVELKOVÁ, M.; RANDÁK, T.; BLAHOVÁ, J.; SLATINSKÉ, I.; SVOBODOVÁ, Z. Biochemical markers for the assessment of aquatic environment contamination. **Interdisciplinary Toxicology**, v.1, n.2, p.169-181, 2008.
- HEROULT, J.; ZULIANI, T.; BUENO, M.; DENAIX, L.; LESPES, G. Analytical advances in butyl-, phenyl- and octyltin speciation analysis in soil by GC-PFPD. **Talanta**, v.75, p.486-493, 2008.

- HIGUCHI, Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, n.4, p.455-464, 2004.
- HOCH, M. Assessment of salinity variations in TBT adsorption onto kaolinite and montmorillonite at different pH levels. **Water, Air and Soil Pollution**, v.152, p.349-362, 2003.
- HOCH, M. Organotin compounds in the environment- an overview. **Applied Geochemistry**, v.16, p.719-743, 2001.
- HOCH, M.; ALONSO-AZCARATE, A.; LISCHICK, M. Assessment of adsorption behavior of dibutyltin (DBT) to clay-rich sediments comparison to the highly toxic tributyltin (TBT). **Environmental Pollution**, v.123, p. 217-227, 2003.
- HORIGUCHI, T.; LEE, J.H.; PARK, J.C.; CHO, H.S.; SHIRAISHI, H.; MORITA, M. Specific accumulation of organotin compounds in tissues of the rock shell, *Thais clavigera*. **Marine Environmental Research**, v.76, p.56-62, 2012.
- HOSTIM-SILVA, M.; VICENTE, M.J.D.; FIGNA, V.; ANDRADE, J.P. Ictiofauna do Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. **Notas Técnicas Facimar**, v.6, p.127-135, 2002.
- HU, J.; ZHEN, H.; WAN, Y.; GAO, J.; AN, W.; AN, L.; JIN, F.; XIAOHUI, J. Thropic magnification of triphenyltin in marine food web of Bohai Bay, North China: Comparison to tributyltin. **Environmental Science and Technology**, v.40, n.10, p. 3142-3147, 2006.
- HUBER, L. Validation of Analytical Methods: review and strategy. **LC-GC Europe**, v.11, n.2, p.96-105, 1998.
- HUERTA, C.I.D. **Estudos sobre a alimentação de espécies de peixes das famílias Ariidae, Carangidae, Guerreidae**, Scianidae, Trichiuridae, Bothidae e Soleidae, no estuário de São Vicente, SP. 1986. 224f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados populacionais**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 2 de maio de 2012.
- ICH. International Conference on Harmonization. **Validation of analytical procedures: text and methodology**. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1), 2005.

- IKEDA, K.; YAMADA, H. Changes in dietary bioaccumulation of tributyltin chloride (TBTCl) in red sea bream (*Pafrus major*) with the concentration in feed. **Water Research**, v.37, p.1497-1504, 2003.
- IKONOMOU, M.G.; FERNANDEZ, M.P.; HE, T.; CULLON, D. Gas chromatography-high resolution mass spectrometry based method for the simultaneous determination of nine organotin compounds in water, sediment and tissue. **Journal of Chromatography A**, v.97, p.319-333, 2002.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. 2003, 35p.
- INZUNZA, B.; ORREGO, R.; PENALOSA, M.; GAVILÁN, J.F.; BARRA, R. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.65, p.242-251, 2006.
- ISHIHARA, Y.; KAWAMI, T.; ISHIDA, A.; YAMAZAKI, T. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochemical International**, v.60, p.782-790, 2012.
- ITAGUAÍ. **Aspectos gerais do Porto de Itaguaí**. Disponível em: <www.itaguaí.rj.gov.br/por_asp>. Acesso em: 1 de Junho de 2012.
- ITAJAÍ. Superintendência do Porto de Itajaí. **Porto de Itajaí**. 2012. Disponível em: <<http://www.portoitajai.com.br>>. Acesso em 18 de Maio de 2012.
- IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Analytical, applied, clinical, inorganic, and physical chemistry divisions interdivisional working party for harmonization of quality assurance schemes for analytical laboratories. **Pure Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.835-855, 2002.
- JADHAV, S.; BHOSALE, D.; BHOSLE, N. Baseline of organotin pollution in fishes, clams, shrimps, squids and crabs collected from the west coast of India. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.2213-2219, 2011.
- JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

- KANNAN, K.; TANABE, S.; IWATA, H.; TATSUKAWA, R. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. **Environmental Pollution**, v.90, p. 279-290, 1995.
- KATSUMITI, A.; VALDEZ DOMINGOS, F.X.; AZEVEDO, M.; SILVA, M.D.; DAMIAN, R.C.; ALMEIDA, M.I.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; CESTARI, M.M.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FREIRE, C.A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuna Oil Spill in a harbor estuarine área in Southern Brazil. **Environmental Monitoring Assessment**, v.152, p.209-222, 2009.
- KAWAI, S.; NAKAYAMA, A. Effects of organotins on the drug metabolizing enzymes in fish. In: ARAI, T., HARINO, H., OHJI, M., LANGSTON, W.J.(Eds). **Ecotoxicology of antifouling biocides**. Springer, 2009, p.235-249.
- KILEMADE, M.; HARTL, M.G.J.; O'HALLORAN, J.O.; O'BRIEN, N.M.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M. Effects of contaminated sediment from Cork Harbour, Ireland on the cytochrome P450 system of turbot. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.747-755, 2009.
- KIM, N.S.; SHIM, W.J.; YIM, U.H.; HA, S.Y.; AN, J.G.; SHIN, K.H. Three decades of TBT contamination in sediments around a large scale shipyard. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p.634-642, 2011.
- KIME, D.E. **Endocrine disruption in fish**. Massachussets: Kluwer Academic, 1998, 597p.
- KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v.173, p.111-133, 2012.
- KIRSCHBAUM, A.A. **Citogenotoxicidade e determinação de metais, PAHs e organoclorados em tecidos de *Cathorops spixii* e *Centropomus parallelus* provenientes de três complexos estuarinos da costa brasileira**. 2010. 269f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- KNOPPERS, B.A.; BRANDINI, F.P.; THAMM, C.A. Ecological studies in the Bay of Paranagua. II. Some physical and chemical characteristics. **Nerítica**, v.2, p.1-36, 1987.
- KNOTT, N.A.; AULBURY, J.P.; BROWN, T.H.; JOHNSTON, E.L. Contemporary ecological threats from historical pollution sources: impacts of large-scale

- resuspension of contaminated sediments on sessile invertebrate recruitment. **Journal of Applied Ecology**, v.46, p.770-781, 2009.
- KOWASLKA, B.; KOWALSKI, D.; ROJEJ, A. Organic compounds migrating from plastic pipes into water. **Journal of Water Supply: Research and Technology**, v.60, n.3, p.137-146, 2011.
- KUCUKSEZGIN, F.; AYDIN-ONEN, S.; GONUL, L.T.; PAZI, I.; KOCAK, F. Assessment of organotin (butyltin species) contamination in merine biota from the Eastern Aegean Sea, Turkey. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.1984-1988, 2011.
- KUNIYOSHI, L.S. **Bioacumulação de elementos-traço e expressão de micronúcleos em *Cathorops spixii* (biomonitor) como ferramentas de avaliação da influência antrópica em dois setores do complexo estuarino lagunar de Cananéia-Iguape, São Paulo, Brasil**. 2011. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- LACORTE, S.; RALDÚA, D.; MARTÍNEZ, E.; NAVARRO, A.; DIEZ, S.; BAYONA, J.M.; BARCELÓ, D. Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). **Environmental Pollution**, v. 140, p.471-482, 2006.
- LANA, P.C.; MARONE, E.; LOPES, R.M.; MACHADO, E.C. The subtropical Estuarine Complexo f Paranagua Bay, Brazil. In: SEELINGER, U., & KJERFVE, B.(Eds). **Coastal Marine Ecosystems of Latin America**. p.131-145. Berlin: Springer, 2001 (Ecological Studies, v.144).
- LANGSTON, W.J.; HARINO, H.; POPE, N.D. Behavior of organotins in the coastal environment. In: ARAI, T., HARINO, H., OHJI, M., LANGSTON, W.J. (Eds) **Ecotoxicology of antifouling biocides**. Berlin: Springer, 2009, p.75-94.
- LANGSTON, W.J.; O'HARA, S.; POPE, N.D.; DAVEY, M.; SHORTRIDGE, E.; IMAMURA, M.; HARINO, H.; KIM, A.; VANE, C.H. Bioaccumulation surveillance in Milford Haven Waterway. **Environmental Monitoring Assessment**, v.184, p. 289-311, 2012.
- LARA-DOMINGUES, A.L.; YAÑEZ-ARACIBIA, A.; LINHARES, F.A. Biologia e ecologia Del bagre *Arius melanopus* Guntjer em Laguna dos Térmitos, sur Del Golfo do México (Pisces: Ariidae). **Centro Ciências del Mar y Limnología**, v.8, n.1, p.267-304, 1981.

- LE GAC, M.; LESPES, G.; POTIN GAUTIER, M. Rapid determination of organotin compounds by headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.999, p.123-134, 2003.
- LEAL, C.; GRANADOS, M.; COMPANÓ, R.; PRAT, M.D. Liquid chromatography with fluorimetric detection of triorganotin compounds in marine biological materials. **Journal of Chromatography A**, v.809, p.39-46, 1998.
- LEE, C.C.; HSIEH, C.Y.; TIEN, C.J. Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments and their potential health risk. **Chemosphere**, v.65, p.547-559, 2006.
- LEE, C.C.; WANG, T.; HSIEH, C.Y.; TIEN, C.J. Organotin contamination in fishes with different living patterns and its implications for human health risk in Taiwan. **Environmental Pollution**, v.137, p.198-208, 2005.
- LEE, R.F. Metabolism of tributyltin by aquatic organisms. In: CHAMP, M.A., SELIGMAN, P.F. (Eds). **Organotin: environmental fate and effects**. London: Chapman & Hall, 1996, 369-382.
- LEE, R.F.; ANDERSON, J.W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.705-72, 2005.
- LEE, R.F.; STERINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v.544, n.1, p.43-64, 2003.
- LEERMAKERS, M.; NUYTTENS, J.; BAEYENS, W. Organotin analysis by gas chromatography-pulsed flame-photometric detection (GC-PFPD). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.381, p.1271-1280, 2005.
- LEITÃO, P.C.; MATEUS, M.; BRAUNSCHEWIG, F.; FERNANDES, L.; NEVES, R. Modelling coastal systems: the MOHID water numerical lab. In: NEVES, R., BARETTA, J.W., MATEUS, M. (Eds). **Perspectives on integrated coastal zone management in South America**. Lisboa: IST, 2008. p. 77-98.
- LENNQUIST, A.; CLANDER, M.C.; FÖRLIN, L. Effects of medetomidine on hepatic EROD activity in three species of fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.74-79, 2008.
- LEUNG, K.M.Y.; KWONG, R.P.Y.; NG, W.C.; HORIGUCHI, T.; QIU, J.W.; YANG, R.; SONG, M.; JIANG, G.; ZHENG, G.J.; LAM, P.K.S. Ecological risk assessment

- of endocrine disrupting organotin compounds using marine neogastropods in Hong Kong. **Chemosphere**, v.54, n.6, p.922-938, 2006.
- LIMA, A.F.A.; CASTRO, I.B.; ROCHA-BARREIRO, C.A. Imposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.24, n.1, p.85-90, 2006.
- LISCIO, C.; DI CARRO, M.; MAGI, E. Comparison of two analytical methods for the determination of organotin compounds in marine organisms. **Comptes rendus Chimie**, v.12, p.831-840, 2009.
- LIU, L.L.; WANG, J.T.; CHUNG, K.N.; LEU, M.Y.; MENG, P.J. Distribution and accumulation of organotin species in seawater, sediments and organisms collected from a Taiwan mariculture area. **Marine Pollution Bulletin**, v.63, p.535-540, 2011.
- LIVINGSTONE, D.R. Contaminant stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, n.8, p.656-666, 2001.
- LOITZENBAUER, E.; MENDES, C.A.B. Salinity dynamics as a tool for water resources management in coastal zones: An application in the Tramandaí River basin, southern Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v.55, p.52-62, 2012.
- LUÍZ-SILVA, W.; MATOS, R.H.R.; KRISTOSCH, G.C.; MACHADO, W. Variabilidade espacial e sazonal da concentração de elementos-traço em sedimentos do sistema estuarino de Santos-Cubatão (SP). **Química Nova**, v.29, n.2, p.256-263, 2006.
- LYSSIMACOU, A.; JENSEN, B.M.; ARUKWE, A. Brain cytochrome P450 aromatase gene isoforms and activity levels in Atlantic Salmon after waterborne exposure to nominal environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol and antifoulant tributyltin. **Toxicological Sciences**, v.91, p.82-92, 2006.
- MACENO, M.M.C. **Avaliação da presença, toxicidade e da possível biomagnificação de HPAs**. 2010, 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) - Universidade Federal do Paraná.
- MACHADO, C. G. **Caracterização química dos agregados e sedimento superficial na Zona de Máxima Turbidez no Complexo Estuarino de Paranaguá**. 2007. Dissertação (Mestrado em Geologia) - Universidade Federal do Paraná.

- MAGALHÃES, C. A.; STRUCHI, P. P.; ASBAHR, M., **Evidências de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Prosobranchia) em áreas portuárias do Estado de São Paulo.** In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 7., 1997, Santos. **Anais...** São Paulo: Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 1997. p.282.
- MAGALHÃES, C.A. **PCBs e pesticidas organoclorados em tecidos de peixes da Baixada Santista, São Paulo.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- MAGINI, C.; HARARI, J.; ABESSA, D.M.S. Circulação recente de sedimentos costeiros nas praias de Santos durante eventos de tempestades: dados para a gestão de impactos físicos costeiros. **Geociências**, v.26, n.4, p.349-355, 2007.
- MANTOVANELLI, A.M. Caracterização da dinâmica hídrica e do material particulado em suspensão na Baía de Paranaguá e em sua bacia de drenagem. **Boletim Paranaense de Geociências**, v.51, p.91-114, 2002.
- MARCELLINO, E.B. **Sistematização dos projetos de emissários submarinos da SAESP e avaliação de desempenho através do modelo computacional CORMIX.** 2000. 272f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo.
- MARCENIUK, A.P.; MENEZES, N. Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. **Zootaxa**, v.1416, p.1-126, 2007.
- MARCENIUK, AP. Chave para identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da costa brasileira. **Instituto de Pesca**, v.31, n.2, p.89-101, 2005.
- MARCIC, C.; LE HECHO, I.; DENAIX, L.; LESPE, G. TBT and TPhT persistence in a sludged soil. **Chemosphere**, v.65, n.11, p.2322-2332, 2006.
- MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: MARKERT, B.A., BREURE, A.M., ZECHMEISTER, H.G (Eds). **Bioindicators and Biomonitoring – Principles, concepts and applications.** Amsterdam: Elsevier, 2003, p.3-40.
- MARONE, E.; GUIMARÃES, M.R.F.; CAMARGO, R.; PRATA JUNIOR, V.P.; KLINGERNFUSS, M.S. **Caracterização física das condições oceanográficas, meteorológicas e costeiras das zonas estuarinas da Baía de Paranaguá.** In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 6., 1995, Mar

- Del Plata. **Resumen...**Mar Del Plata: Universidad Nacional de Mar Del Plata, 1995, p.129.
- MARONE, E.; MACHADO, E.C.; LOPES, R.M.; SILVA, E.T. Land-ocean fluxes in the Paranaguá Bay Estuarine System. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.53, p.169-181p, 2005.
- MARONE, E.; NOERNBERG, M.A.; DOS SANTOS, I.; LAUTERT, L.F.; ANDREOLI, O.R.; BUBA, H.; FILL, H.D. Hydrodynamic of Guaratuba Bay, PR, Brazil. **Journal of Coastal Research**, v.39, p.1879-1883, 2004.
- MARTINS, C.C. **Marcadores Orgânicos Geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho.** 2005. 237f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- MARTINS, F.C. **Influência de correntes na Plataforma Adjacente na Hidrodinâmica das Baías da Ilha Grande e Sepetiba, RJ.** 2008. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Oceânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- MCALLISTER, B.G.; KIME, D.E. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.65, p.309-316, 2003.
- MEADOR, J.P. Comparative toxicokinetics of tributyltin in Five marine species and its utility in predicting bioaccumulation and acute toxicity. **Aquatic Toxicology**, v.37, p.307-326, 1997.
- MEADOR, J.P.; COLLIER, T.K.; STEIN, J. Determination of a tissue and sediment threshold for tributyltin to protect prey species of juvenile salmonids listed under the US Endangered Species Act. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v.12, p.539-551, 2002.
- MECHLINSKA, A.; WOLSKA, L.; NAMIESNIK, J. Removal of sulfur from a solvent extract. **Trends in Analytical Chemistry**, v.31, p.129-133, 2012.
- MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, p.426-435, 2007.
- MENDONÇA, J.T. **Gestão dos recursos pesqueiros do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida, Litoral Sul de São Paulo, Brasil.**

2007. 384f. Tese (Doutorado em Ecologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos.
- MENG, P.J.; LIN, J.; LIU, L.L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.8-15, 2009.
- MENICONI, M.F.G. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes**. 2007. 186f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- MICHAUD, M.H.; PELLETIER, É. Sources and fate of butyltins in the St. Lawrence Estuary ecosystem. **Chemosphere**, v.64, p.1074-1082, 2006.
- MĚČÍČ, M.; BIHARI, N.; JAKSIC, Z.; MÜLLER, W.E.G.; BATEL, R. DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v.53, p.243-262, 2002.
- MIKI, S.; IKEDAM K.; OBA, Y.; SATONE, H.; HONDA, M.; SHIMASAKI, Y.; ONIKURA, N.; ARAKAWA, O.; OSHIMA, Y. Tributyltin in blood of marine fish collected from a coastal area of northern Kyushu, Japan. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.2533-2536, 2011.
- MIRANDA, L.B.; CASTRO, B.M.; KJERFVE, B. Por que estudar estuários? In: Miranda, L.B. **Princípios de Oceanografia Física de Estuários**. São Paulo: Edusp., 2002, p.27-31.
- MISHIMA, M.; TANJI, S. Distribuição geográfica dos bagres marinhos (Osteichthyes, Ariidae) no complexo estuarino-lagunar de Cananéia (25°S, 48°W). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.8, p.157-172, 1981.
- MIYAO, S.Y.; HARARI, J. Estudo preliminar da maré e das correntes de maré da região estuarina de Cananéia (25°S-48°W). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v.37, n2, p.107-123, 1989.
- MIZERKOWSKI, B.D. **Modelo comparativo do estado trófico estuarino: Babitonga, Guaratuba, Laranjeiras e Cananéia**. 2007. 134f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Universidade Federal do Paraná.
- MOCHIDA, K.; FUJII, K. Toxicity for aquatic organisms. In: ARAI, T., HARINO, H., OHJI, M., LANGSTON, W.J. (Eds). **Ecotoxicology of antifouling biocides**. Berlin: Springer, 2009, 149-160.
- MOCHIDA, K.; ITO, K.; KONO, K.; ONDUKA, T.; KAKUNO, A.; FUJII, K. Molecular and histological evaluation of tributyltin toxicity on spermatogenesis in a

- marine fish, the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Aquatic Toxicology**, v.83, p.73-83, 2007.
- MOLISANI, M.M.; MARINS, R.V.; MACHADO, W. Environmental changes in Sepetiba Bay, SE Brazil. **Regional Environmental Change**, v.4, p.17-27, 2004.
- MONDIN, A.C. **Caracterização toxicológica de peçonhas do bagre marinho *Cathorops spixii* (Ariidae)**. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo.
- MORABITO, R.; MASSANISSO, P.; QUEVAUVILLER, P. Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, n2, p.113-119, 2000.
- MORAIS, L.; PEDRUZI, F.C.; AMORIM, V.S.; COSTA, M.B.; FERNANDEZ, M.A.S.; SANTOS, D.M.; MARCHI, M.R.R. Avaliação da contaminação por tributilestano por meio de transplante de *Leucozonia nassa* (Gastropoda; Fascioliidae) e análise química de sedimento em área portuária na Baía de Vitória, ES, Brasil. Livro de resumos. **XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**. 19 a 23 de setembro de 2010, Bombinhas, SC.
- MORCILO, Y.; BORGHI, V.; PORTE, C. Survey of organotin compounds in the western Mediterranean using molluscs and fish as sentinel organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.32, p.198-203, 1997.
- MORTENSEN, A.S.; ARUKWE, A. Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.145, p.431-441, 2007.
- MZOUGH, N.; LESPES, G.; BRAVO, M.; DACHRAOUI, M.; GAUTIER, M.P. Organotin speciation in Bizerte lagoon (Tunisia). **Science of the Total Environment**, v.349, p.211-222, 2005.
- NAKAYAMA, K.; OSHIMA, Y. Adverse effects of tributyltin on reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **Coastal Marine Sciences**, v.32, p.67-76, 2008.
- NARASAKI, H.; HOU, H.B.; MORIMURA, Y. Determination of organotin compounds in fish by gas chromatography-Atomic absorption spectrometry using 8-quinolinol as a complexing agent. **Analytical Sciences**, v.16, p.855-858, 2000.
- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, 1994, 600p.

- NEWMAN, M.C. **Fundamentals of Ecotoxicology**. New York: Lewis Publishers, 2001. 401p.
- NRC. Comitee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. **Environmental Heath Perspectives**, v.74, p.3-9, 1987.
- NUYTSENS, J. **Evaluation of the GC-PFPD for the Determination of Organotin Compounds in Environmental Samples**. Vrije Universiteit Brussel, 2004.
- O'HALLORAN, K.; AHOKAS, J.T.; WRIGHT, P.F.A. Response of fish immune cells to in vitro organotin exposures. **Aquatic Toxicology**, n.40, p.141-156, 1998.
- OHJI, M.; ARAI, T.; MIYAZAKI, N. Comparision of organotin accumulation in the masu salmon *Oncorhynchus masou* accompanying migratory histories. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.72, p.721-731, 2007.
- OHJI, M.; HARINO, H.; ARAI, T. Comparision of organotin accumulation on the White-spotted charr *Salvelinus leucomaenis* between sea-run and freshwater-resident types. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v.91, p.158-162, 2011.
- OHJI, M.; HARINO, H.; ARAI, T. Differences on organotin accumulation among ecological migratory types of the Japanese eel *Anguilla japonica*. **Estuarine Coastal and Shelf Sciece**, V.69, P.270-290, 2006.
- OKORO, H.K.; FATOKI, O.S.; ADEKOLA, A.; XIMBA, B.J.; SNYMAN, R.G.; OPEOLU, B. Human exposure, biomarkers, and fate of organotin in the environment. In: WHITACRE, D.M. (Ed) **Reviews of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer, 2011, p. 27-54.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; SIAH, A.; PELLETIER, E. Sub-chronic and trophic effects of TBT and DBT in American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.4, n.1-3, p.31-36, 2009.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; RCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camarge Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, n.74, p.53-69, 2005.
- OLIVEIRA, A.C.M.; MUTO, E.Y.; SOARES, L.S.H. **Alimentação do bagre amarelo *Cathorops spixii* no litoral do estado de São Paulo: resultados preliminares**. 2005. Disponível em: <<http://cecm.usp.br>>. Acesso em 25 de junho de 2012.

- OLIVEIRA, C.R. **Determinação de Biomarcadores e compostos organoestânicos em amostras de sedimentos superficiais de três regiões portuárias do Estado de Santa Catarina, Brasil.** 2010. 156f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- OLIVEIRA, C.R.; SANTOS, D.M.; MADUREIRA, L.A.S.; MARCHI, M.R.R. Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. **Journal of Harzadous Materials**, v.181, p.851-856, 2010.
- OLIVEIRA, F.A.; MAZZER, A.M.; GONÇALVES, M.L.; SANTANA, N.A. **Elaboração de produtos cartográficos básicos para o estudo geomorfológico no complexo hídrico da Baía da Babitonga, SC.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA FÍSICA APLICADA, 10., 2003. Rio de Janeiro. Resumo...Rio de Janeiro: UERJ, 2003.
- OLIVEIRA, M.; AHMAD, I.; MARIA, V.L.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Monitoring pollution of coastal lagoon using *Liza aurata* kidney oxidative stress and genetic endpoints: an integrated biomarker approach. **Ecotoxicology**, v.19, p.643-653, 2010.
- OLIVEIRA, R. C.; SANTELLI, R.E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v.82, p.9-24, 2010.
- PADRÓS, J.; PELLETIER, É.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. Metabolic interactions between low doses of benzo(a)pyrene and tributyltin in artic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.192, p.45-55, 2003.
- PAIT, A.S.; NELSON, J.O. **Endocrine disruption in fish: an assessment of recent research and results.** Silver Spring, MD: NOAA, 2002. 55p. (NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS CCMA, n. 149).
- PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hidricos. Instituto Ambiental do Paraná. **Plano de Manejo da Área de Proteção Ambiental de Guaratuba.** Curitiba: SEMA, 2006a, 259p.
- PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Paraná Mar e Costa:** subsídios ao ordenamento das áreas estuarinas e costeiras do Paraná. Curitiba: SEMA, 2006b. 144p.
- PATIRE, V.F. **Avaliação da biodisponibilidade dos HPAs em Mugil curema do estuário de Santos e de Cananéia através da análise de metabólitos de HPAs em**

- bile de peixes**. 2010. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.
- PELLEGRINI, J.A.C. **Caracterização da planície hipersalina (Apicum) associada a um bosque de mangue em Guaratiba, baía de Sepetiba, Rio de Janeiro-RJ**. 2000. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- PEREIRA-FILHO, J. **Dinâmica Biogeoquímica do Estuário do Rio Itajaí-Açu, SC**. 2006. 174f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos.
- PERINA, F.C.; ABESSA, D.M.S.; PINHO, G.L.L.; FILLMAN, G. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. **Ecotoxicology**, v.20, n.8, p.1870-1880, 2011.
- PESSOA, I.; FERNANDEZ, M.; TOSTE, R.; DORE, M.; PARAHYBA, M. Imposex in a touristic area in Southeastern Brazilian coast. **Journal of Coastal Research**, v.56, p.881-884, 2009.
- PINEL-RAFFAITIN, P.; AMOROUX, D.; LEHÉCHO, I.; RODRÍGUEZ-GONZALEZ, P.; POTIN-GAUTIER, M. Occurrence and distribution of organotin compounds in leachates and biogases from municipal landfills. **Water Research**, v.42, p.987-996, 2008.
- PINHEIRO, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; FRAGOSO, M.R.; QUADROS, J.P.; CAMILO JR., E.; SANTOS, F.A. 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**, v.39, p.1383-1388, 2006.
- PINHEIRO, H.T.; MARTINS, A.S.; ARAÚJO, J.N. Demersal fish communities may indicate priority áreas for marine resources conservation. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v.6, n.3, p.210-221, 2001.
- PINHO, G.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v.32, n.4, p.987-995, 2009.
- PINOCHET, H.; TESSINI, C.; BRAVO, M.; QUIROZ, W.; GREGORI, I. Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay-Chile. **Environmental Monitoring Assessment**, v.155, p.341-353, 2009.

- PIZZUTTI, I.R.; SCHERZ, L.; VIARO, N.S.S.; ADAIME, M.B. Estudo da determinação dos grupos silanóis (-SiOH) em sílica- Aplicação à materiais de recheio utilizados em cromatografia gasosa. **Química Nova**, v.20, n.3, p.267-269, 1996.
- PLETSCH, A.L.; BERETTA, M.; TAVARES, T.M. Distribuição especial de compostos orgânicos de estanho em sedimentos costeiros e em *Phallusia nigra* da Baía de Todos os Santos e litoral norte da Bahia-Brasil. **Química Nova**, v.33, n.2, p.451-457, 2010.
- POSSATO, F.E.; BARLETTA, M.; COSTA, M.F.; IVAR DO SUL, J.A.; DANTAS, D.V. Plastic debris ingestion by marine catfish: na unexpected fisheries impact. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.1098-1102, 2011.
- PRITCHARD, D. Observations of circulation in coastal plains estuaries. **Estuaries, American Association for the Advancement of Science, Washington**, n.83, p.37-44, 1967.
- QUADROS, J.P.; CAMILLO JR, E.; PINHEIRO, F.; FERNANDEZ, M.A.S. Imposex as na indicator of organotin pollution at Rio de Janeiro South Coast: Sepetiba and Ilha Grande Bays. **Thalassas**, v. 25, n.1, p.19-30, 2009.
- QUEVAUVILLER, P. The analysis of butylated tin compounds in the environment and in biological materials. In: DE MORA, S.J. (Ed). **Tributyltin**: case study of an environmental contaminant. Cambridge University Press, 1996. P.63-93. (Cambridge Environmental Series, v.8).
- RABITTO, I.S.; ABILHÔA, V. A alimentação do bagre *Genidens genidens* Valenciennes, 1839 em um banco arenoso da Ilha do Mel, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências veterinárias e zoológicas UNIPAR**, v.2, n.2, p.143-153, 1999.
- RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.147-156, 2005.
- RADKE, B.; STANISZEWSKA, M.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J.; BOLALEK, J. Organotin Compounds in Marine Sediments. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.17, n.5, p.643-654, 2008.

- RAMASWAMY, B.R.; TAO, H.; HOJO, M. Contamination and biomethylation of organotin compounds in pearl/fish culture areas in Japan. **Analytical Sciences**, v.20, p.45-53, 2004.
- RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2011. 178f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná.
- RANK, J. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbor pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1271-1277, 2009.
- REIS, E.G. **A pesca artesanal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos (RS)**. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 1986. 21p.
- REYNOLDS, W.J.; FEIST, S.W.; JONES, G.J.; LYONS, B.P.; SHEAHAN, D.A.; STENTIFORD, G.D. Comparision of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. **Chemosphere**, v.52, p.1135-1145, 2003.
- REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D.; OVALLE, A.R.C.; SILVA, L.F.F. Dial organic fluctuations in a mangrove tidal creek in Sepetiba bay, Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, n.4, p.637-680, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO NETO, F.B. **Análise ecomorfológica das comunidades de peixes do complexo baía-estuário de Santos e São Vicente**. 1993. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- ROBERTS, D. Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. **Environmental International**, v.40, p.230-243, 2012.
- RÜDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, p.180-189, 2003.
- SÁ, F. Distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e atividades de dragagem no Complexo Estuarino de Paranaguá, PR. **Boletim Paranaense de Geociências**, v.53, p.83-92, 2004.

- SAARI, E.; PERÄMÄKI, P.; JALONEN, J. Effect of sample matrix on determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by gas chromatography-flame ionization detection. **Microchemical Journal**, v.87, p.113-118, 2007.
- SAMPAIO, A.F.P. **Avaliação da correlação entre parâmetros de qualidade da água e socioeconômicos no complexo estuarino de Santos-São Vicente, através de modelagem numérica ambiental**. 2010. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - Universidade de São Paulo.
- SANT'ANNA, B.S. **Assimilação, depuração e contaminação do ermitão *Clibanarius vittatus* pelo poluente tributilestanho (TBT) e sua relação com a intersexualidade em ermitões**. 2011. 131f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista.
- SANTA CATARINA. **Porto de São Francisco do Sul**. Administração do Porto de São Francisco do Sul. 2012. Disponível em: <<http://www.spfsf.sc.gov.br>>. Acesso em 18 de maio de 2012.
- SANTOS, A.F. **Ecologia alimentar do bagre-amarelo, *Arius spixii* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Ariidae), na enseada de Caraguatatuba, São Paulo**. 2004. 34f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos.
- SANTOS, D.M. **Compostos organoestânicos no material particulado em suspensão e sedimentos superficiais no eixo leste-oeste do complexo estuarino de Paranaguá, PR**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Universidade Federal do Paraná.
- SANTOS, D.M.; ARAÚJO, I.P.; MACHADO, E.C.M.; CARVALHO-FILHO, M.A.S.; FERNANDEZ, M.A.; MARCHI, M.R.R.; GODOI, A.F.L. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.1922-1952, 2009.
- SANTOS, D.M.; SANT'ANNA, B.S.; GODOI, A.F.L.; TURRA, A.; MARCHI, M.R.R. Contamination and impact of organotin compounds in the Brazilian coast. In: ORTIZ, A.C. AND GRIFFIN, N.B. (Eds). **Pollution Monitoring**. New York: Nova Science Publishers, 2011, p.31-59.
- SANTOS, D.M.; SANT'ANNA, B.S.; SANDRON, D.C.; SOUZA, S.C.; CRISTALE, J.; MARCHI, M.R.R.; TURRA, A. Occurrence and behavior of butyltins in intertidal

- and shallow subtidal surface sediments of an estuarine beach under different sampling conditions. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 88, p.322-328, 2010.
- SANTOS, L. **Classificação do Litoral de Marataízes, Espírito Santo, quanto à vulnerabilidade erosiva**. 2005. 144f. Monografia (Graduação em Oceanografia), Universidade Federal do Espírito Santo.
- SANTOS, L.O. **Ictiofauna demersal em diferentes setores da Baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Universidade Federal do Paraná.
- SÃO PAULO. Agência Metropolitana da Baixada Santista. Plano de Bacia Hidrográfica para o quadriênio 2008-2011 do comitê de bacia hidrográfica da Baixada Santista. Santos: AGEM, 2008. 78p. Relatório 1. Disponível em: <<http://www.agem.sp.gov.br>>. Acesso em 18 de maio de 2012.
- SCHETTINI, C.A.F. Caracterização física do estuário do Rio Itajaí-açu, SC. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.7, n.1, p.123-142, 2002.
- SCHETTINI, C.A.F.; TRUCCOLO, E.C. **Dinâmica da intrusão salina no estuário do rio Itajaí-Açu**. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 8., 1999, Trujillo. **Resúmenes...**p.639-640.
- SCHMIDT, T.C.S.; MARTINS, I.A.; REIGADA, A.L.D.; DIAS, J.F. Taxocenose de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da região estuarina de São Vicente, Sp, Brasil. **Biota Neotropica**, v.8, n.4, p.73-81, 2008.
- SCHUBERT, P.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, I.; ROSENBERG, E.; BAYONA, J.M. Evaluation of sesulfurization procedures for the elimination of sulphur interferences in the organotin analysis of sediments. **Journal of Chromatography A**, v.810, p.245-251, 1998.
- SCHWAIGER, J.; BUCHER, F.; FERLING, H.; KALBFUS, W.; NEELE, R.D. A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v.23, p.31-48, 1992.
- SCHWARZ JR. R.; FRANCO, A.C.N.P.; SPACH, H.L.; SANTOS, C.; PICHLER, H.A.; QUEIROZ, G.M.N. Variação da estrutura espacial da ictiofauna demersal capturada com rede de arrasto de porta na Baía dos Pinheiros, PR. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.33, n.2, p.157-169, 2007.

- SCZEPANSKI, T.S. **Caracterização cromossômica de espécies da família Ariidae (Teleostei, Siluriformes) pertencentes ao litoral paranaense.** 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná.
- SELIGMAN, P.F.; MAGUIRE, R.J.; LEE, R.F.; HINGA, K.R.; VALKIRS, A.O.; STANG, P.M. Persistence and fate of tributyltin in aquatic ecosystems. In: CHAMP, M.A. E SELIGMAN, P.F. (Eds). **Organotin: environmental fate and effects.** London: Chapman & Hall, 1996, 629p.
- SENDA, T. International trends in regulatory aspects. In: ARAI, T., HARINO, H., OHJI, M., LANGSTON, W.J. (Eds). **Ecotoxicology of antifouling biocides.** Tokyo: Springer, 2009, p.23-34.
- SHAWKY, S.; EMONS, H. Distribution pattern of organotin compounds at different trophic levels of aquatic ecosystems. **Chemosphere**, v.36, n.3, p.523-535, 1997.
- SHEPARD, K.L. Functions for fish muçus. **Fish Biology**, v.4, p.401-429, 1994.
- SHIM, W.J.; JEON, J.K.; HONG, S.H.; KIM, N.S.; YIM, U.H.; OH, J.R.; SHIN, Y.B. Accumulation of tributyltin in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: its effect on hepatic cytochrome P450. **Archives in Environmental Contamination Toxicology**, v.44, n.3, p.390-397, 2003.
- SHIMASAKI, Y.; KITANO, T.; OSHIMA, Y. Tributyltin causes masculinization in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, p.141-144, 2003.
- SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em 1 de Maio de 2012.
- SILVA, C.A. **Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná.** 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná.
- SILVA, J.C. **Biomarcadores morfológicos e análise química da bile em peixes para a avaliação da qualidade da água do rio Iguaçu.** 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná.
- SILVA, J.G.F.; ULIANA, E.M.; MARTINS, C.A.S. **Estimativa da evapotranspiração potencial da Bacia do Rio Itapemirim.** XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 17., 2011, Guarapari. Anais...Guarapari: SESC, 2011. p.5.

- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.
- SOLÉ, M.; ANTÓ, M.; BAENA, M.; CARRASSON, M.; CARTES, J.E.; MAYNOU, F. Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope Waters in relation to some of their biological and ecological variables. **Marine Environmental Research**, v.70, p.181-188, 2010.
- SOUSA, A.C.A. **Estudo do impacto da poluição por tributilestanho (TBT) na costa portuguesa**. 2004. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências das Zonas Costeiras) - Universidade de Aveiro, Portugal.
- SOUZA, G.M. **Levantamento GPR em cordões litorâneos para o estudo de reservatórios anáçogos. Estudo de caso no município de Marataízes, Espírito Santo**. 2005. 44f. Monografia (Graduação em Geologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D.S. (Ed). **DNA repair protocols: eucaryotic systems**. Totowa: Humana Press, 1999. p.203-211. (Methods in molecular biology, v.113).
- STAB, J.A.; TRAAS, T.P.; STROMBERG, G.; KESTEREN, J.; LEONARDS, P.; VAN HATTUN, B.; BRINKMAN, U.A.T.; CONFINO, W.P. Determination of organotin compounds in the foodweb of a shallow freshwater lake in the Netherlands. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.31, p.319-328, 1996.
- STANISZEWSKA, M.; RADKE, B.; NAMIÉŚNIK, J.; BOLALEK, J. Analytical methods and problems related to the determination of organotin compounds in marine sediments. **Environmental Analytical Chemistry**, v.88, n.11, p.747-774, 2008.
- STEFENS, J.L. **Caracterização molecular de compostos orgânicos biogênicos e antropogênicos em sedimentos da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro (RJ)**. 2006. 127f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- STEIN, C.E. **Estudo do papel da *Spartina alterniflora* como espécie bioindicadora de contaminação por elementos traço no Complexo Estuarino Lagunar de**

- Cananéia-Iguape (SP).** 2011. 151f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- STORM, M. **The use of liquid chromatography mass spectrometry for the absolute quantitation of bio-analytes.** 2008. 256f. Thesis (Doctoral) - Faculty of Pharmaceutical Sciences. Universiteit Gent. Belgium.
- STRAND, J.; JACOBSEN J.A. Accumulation and thropic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. **Science of the Total Environment**, v.350, p.72-85, 2005.
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. **A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of Fish Resources**, v.167, p.1-311, 1968.
- STRONKHORST, J.; HATTUN, B. Contaminants of concern in Dutch Marine Harbor Sediments. **Archives in Environmental and Contamination Toxicology**, v.45, p.306-316, 2003.
- SUDARYANTO, A.; TAKAHASHI, S.; IWATA, H.; TANABE, S.; MUCHTAR, M.; RAZAK, H. Organotin residues and the role of anthropogenic tin sources in the coastal marine environment of Indonesia. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.208-236, 2005.
- SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia.** São Paulo: Edgard Blücher, 1973, 137p.
- TAIROVA, Z.M.; STRAND, J.; CHEVALIER, J.; ANDERSEN, O. PAH biomarkers in common eelpout (*Zoarces viviparous*) from Danish waters. **Marine Environmental Research**, v.75, p.45-53, 2012.
- TAKAHASHI, S.; MUKAI, H.; TANABE, S.; SAKAYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MASUONO, H. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and plastic products. **Environmental pollution**, v.106, n.2, p.213-218, 1999.
- TANG, C. H.; WANG, W.H. Optimization of an analytical method for determining organotin compounds in fish tissue by base-hydrolysis pretreatment and simultaneous ethylation-extraction procedures. **Analytica Chimica Acta**, v.581, p.370-376, 2007.
- TESSIER, E.; AMOROUX, D.; MORIN, A.; CHRISTIANM L.; THYBAUD, E.; VINDIMIAN, E.; DONARD, O.F.X. (Tri)Butyltin biotic degradation rates and pathways in different compartments of a freshwater model ecosystem. **Science of the Total Environment**, v.388, p. 214-233, 2007.

- TESSLER, M.G.; SOUZA, L.A.P. Dinâmica sedimentar e feições sedimentares identificadas na superfície de fundo do sistema Cananéia-Iguape, SP. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v.46, n.1, p.69-83, 1998.
- TEUGELS, G.G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. **Aquatic Living Resource**, v.9, p.9-34, 1996.
- THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987.
- THOMPSON, E.D.; BURWINKEL, K.E.; CHAVA, A.K.; NOTCH, E.G.; MAYER, G.D. Activity of Phase I and Phase II enzymes of the benzo(a)pyrene transformation pathway in zebrafish (*Danio rerio*) following waterborne exposure to arsenite. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.152, n.3, p.371-378, 2010.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p.835-855, 2002.
- TODESCHINI, M.E. **Dinâmica espacial e temporal das características físicas e químicas do Rio Cubatão e ordenação espacial da bacia hidrográfica**. 2004. 144f. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) - Universidade Federal do Paraná.
- TORRES, R.J. **Efeitos da dragagem sobre a qualidade de sedimentos contaminados do canal do Porto de Santos: biodisponibilidade e toxicidade de metais e compostos orgânicos persistentes**. 2008. 159f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de São Carlos.
- TRANT, J.M.; LEHRTER, J.; GREGORY, T.; NUNEZ, S.; WUNDER, J. Expression of Cytochrome P450 Aromatase in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.61, p.393-397, 1997.
- TRUCCOLO, E.C. **Hidrodinâmica em frequência mareal e submareal do estuário do Rio Itajaí-Açu, SC**. 2009. 204f. Tese (Doutorado em Geociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M.; HARADA, H. The influence of pH on the accumulation of tri-n-butyltin chloride and triphenyltin chloride in carp. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.95, p.151-153, 1990.
- TURNER, A. Marine pollution from antifouling paint particles. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p.159-171, 2010.

- TUVIKENE, A. Response of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Annales Zoologic Fennici**, v.32, p.295-309, 1995.
- UNGER, M.A.; MACINTYRE, W.G.; HUGGET, R.J. Sorption behavior of tributyltin on estuarine and freshwater sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.7, p.907-915, 1988.
- VALDEZ DOMINGOS, F.X.; ASSIS, H.C.S.; SILVA, M.D.; DAMIAN, R.C.; ALMEIDA, A.I.M.; CESTARI, M.M.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Anthropic impact evaluation of two Brazilian estuaries through biomarkers in fish. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.4, n.1-3, p.21-30, 2009.
- VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C.R.F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Chemkeys, 2006. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com.br>>. Acesso em 12 de maio de 2012.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.
- VAN DER WEIDEN, M.E.J.; TIBOSCH, H.J.H.; BLEUMINK, R.; SINNIGE, T.L.; GUCHTE, C.; SEINEN, W.; BERG, M. Cytochrome P450 1A induction in the common carp (*Cyprinus carpio*) following exposure to contaminated sediments with halogenated polyaromatics. **Chemosphere**, v.27, n.7, p.1297-1309, 1993.
- VAN DYK, J.C.; COCHRAN M.J.; WAGENAAR, G.M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v.87, p.301-311, 2012.
- VAZZOLER A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM/NUPÉLIA, 1996, 169p.
- VELLA, A.J.; MINTOFF, B.; AXIAK, V. Analytical aspects of the gas chromatographic determination of tributyltin and metabolites in environmental samples. **The Science of the Total Environment**, v.258, p.81-88, 2000.
- VIEIRA, C.V.; HORN-FILHO, N.O.; BONETTI, C.V.H.; BONETTI, J. Caracterização morfosedimentar e setorização do complexo estuarino da Baía da Babitonga, SC. **Boletim Paranaense de Geociências**, n. 62-63, p.85-105, 2008.
- VIGLINO, L.; PELLETIER, É.; LEE, L.E.J. Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and imposex occurrence in common

- whelk (*Buccinum undatum*). **Archives in Environmental Contamination and Toxicology**, v.50, p.45-59, 2006.
- WAITE, M.E.; WALDOCK, M.J.; THAIN, J.E.; SMITH, D.J.; MILTON, S.M. Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987. **Marine Environmental Research**, v.32, p.89-111, 1991.
- WANG, C.; ZAO, Y.; ZHENG, R.; DING, X.; WEI, W.; ZUO, Z.; CHEN, Y. Effects of tributyltin, benzo(a)pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastes marmoratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.65, p.381-387, 2005.
- WANG, X.; HONG, H.; ZHAO, D.; HONG, L. Environmental behavior of organotin compounds in the coastal environment of Xiamen, China. **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p.419-424, 2008.
- WARD, G.S.; GRAMM, G.C.; PARRISH, P.R.; TRACHMAN, H.; SLESINGER, A. Bioaccumulation and chronic toxicity of bis (tributyltin) oxide (TBTO): tests with a saltwater fish. In: BRANSON, D.R., DICKSON, K.L. (Eds). **Aquatic toxicology and hazard assessment**. Philadelphia: American Society for testing materials, 1981. P.183-200.
- WASIK, A.; RADKE, B.; BOLALEK, J.; NAMIESNIK, J. Optimisation of pressurized liquid extraction for elimination of sulphur interferences during determination of organotin compounds in sulphur-rich sediments by gas chromatography with flame photometric detection. **Chemosphere**, v.68, p.1-9, 2007.
- WASSERMAN, J.C.; WASSERMAN, M.A. Comportamento de metais em sedimentos. In: BAPTISTA NETO, J.A., WALLNER-KERSANACH, M., PATCHINEELAM S.M. (Orgs.) **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2008, p.197-236.
- WENTWORTH, C.K. A scale of grade and terms for clastic sediments. **Journal of Geology**, v.50, p.377-392, 1922.
- WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria: Tributyltin compounds**. Geneva, WHO: 1997. 272p.
- WISHKOVSKY, A.; MATHEUS, E.S.; WEEKS, B.A. Effects of tributyltin on the chemiluminescent response of phagocytes from three species of estuarine fish. **Archives of Environmental and Contamination Toxicology**, v.18, p.826-831, 1989.
- XIAO, Q.; HU, B.; HE, M. Speciation of butyltin compounds in environmental and biological samples using headspace single drop microextraction coupled with gas

- chromatography-inductively plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1211, p.135-141, 2008.
- XIAO, X.; SHENG, D.; QIU, Y. Improved understading of tributyltin sorption on natural and biochar-amended sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, n.12, p.2682-2687, 2011.
- YAMAMOTO, J.; YONEZAWA, Y.; NAKATA, K.; HORIGUCHI, F. Ecological risk assessment of TBT in Ise Bay. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.41-50, 2008.
- YANG, L.; ZOLTAN, M.; STURGEON, R.E. Determination of butyltin species in a sediment certified reference material by HPLC and GC ICP MS. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, v.48, n.4, p.211-218, 2003.
- ZBOROWSKI, M.B. **Conflitos ambientais na Baía de Sepetiba: o caso dos pescadores atingidos pelo processo de implantação do complexo industrial da Companhia Siderúrgica do Atlântico (ThyssenKrupp CSA)**. 2008. 254f. Dissertação (Mestrado em Psicossociologia de Comunidades e Ecologia Social) - Universidade Federal Do Rio de Janeiro.
- ZEM, R.C. **Distribuição dos sedimentos de fundo da Baía de Guaratuba-Paraná**. 2005. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Paraná.
- ZHANG, J.; ZUO, Z.; CHEN, R.; CHEN, Y.; WANG, C. Tributyltin exposure causes brain damage in *Sebastiscus marmoratus*. **Chemosphere**, v.73, p.337-343, 2007.
- ZULANI, T.; LESPES, G.; MILACIC, R.; SCANCAR, J.; GAUTIER, M.P. Comprehensive study of the parameters influencing the detection of organotin compounds by a pulsed flame photometric detector in sewage sludge. **Journal of Chromatography A**, v.1188, p.281-285, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Resultados obtidos na análise de BTs em sedimetnos superficiais sem a correção pelo TPrT e a recuperação obtida para esse surrogate nas amostras.

Amostra	TBT	DBT	MBT	TPrT (%)
ITA -1^a	-	-	-	-
ITA -2	124±21	17±3	n.d.	54±26
ITA -3	<LQ	n.d.	24±13	79±25
BAB -1	n.d.	n.d.	n.d.	^b
BAB -2	n.d.	n.d.	n.d.	160±11
BAB -3	n.d.	n.d.	n.d.	93±19
GTB -1	<LQ	n.d.	n.d.	85±15
GTB -2	n.d.	n.d.	n.d.	88±12
GTB -3	n.d.	n.d.	n.d.	91±11
PNG- 1	n.d.	24±10	59±17	78±16
PNG-2	<LQ	n.d.	n.d.	89±6
PNG -3	240±33	<LQ	249±0,5	86±12
CAN -1	<LQ	16±8	n.d.	82±5
CAN -2	<LQ	n.d.	n.d.	89±6
CAN -3	<LQ	n.d.	n.d.	71±4
STO -1	21±4	50±4	n.d.	79±14
STO -2	n.d.	24±7	n.d.	94±12
STO -3	n.d.	30±6,5	34±8	97±21
SEP -1	n.d.	427±14	55±1,1	126±8
SEP -2	n.d.	n.d.	n.d.	86±18
SEP -3	n.d.	n.d.	n.d.	97±9
IPM -1	<LQ	n.d.	n.d.	109±20
IPM -2	n.d.	n.d.	n.d.	112±18
IPM -3	n.d.	n.d.	n.d.	100±0,2

^a amostra suja; ^b pico interferente no tempo de retenção do TPrT; n.d. não detectado; <LQ abaixo do limite de quantificação.

APÊNDICE 2

Concentração de material particulado em suspensão, resultados obtidos na análise de BTs nessa matriz sem a correção pelo TPrT e a recuperação obtida para esse surrogate nas amostras.

Amostra	Densidade MPS (mg dm³)	TBT	DBT	MBT	TPrT (%)
ITA -1^a	141,6	-	-	-	-
ITA -2	37,7	<LQ	3,2	<LQ	63
ITA -3^a	101,2	-	-	-	-
BAB -1	191	2,17	n.d	30	50
BAB -2	38,96	4,5	n.d	21	51
BAB -3	114,22	n.d.	n.d	38	72
GTB -1	111,2	n.d.	n.d.	82	68
GTB -2	60,44	n.d.	n.d.	n.d.	77
GTB -3	79,98	15	4,7	81	59
PNG- 1	54,9	46	90	141	85
PNG-2	55,3	31	24	85	96
PNG -3^a	62,2	-	-	-	-
CAN -1	38,8	4,74	3,8	<LQ	72
CAN -2	36,5	3,81	<LQ	<LQ	61
CAN -3	25,2	6,3	3,5	<LQ	91
STO -1	11,3	38,7	5,4	<LQ	78
STO -2	13,49	86,7	4,9	<LQ	114
STO -3	23,95	21,7	3,9	<LQ	87
SEP -1	61,32	5,3	16,5	10,7	65
SEP -2^a	297,37	-	-	-	-
SEP -3	105,05	25	6	121	69
IPM -1	441,5	25	n.d	n.d	73
IPM -2	19,47	28	n.d	n.d	101
IPM -3	94,56	n.d	n.d	n.d	79

^a amostra suja; n.d. não detectado; <LQ: abaixo do limite de quantificação.

APÊNDICE 3

Teor de lipídios totais (%), resultados obtidos na análise de BTs no fígado de bagres estuarinos sem a correção pelo TPrT e a recuperação obtida para esse surrogate nas amostras.

Amostra	Lipídios Totais (%)	TBT	DBT	MBT	TPrT (%)
ITA -1	21,42	402±8	1327±25	426±14	93±10
ITA -2	23,79	95±8	<LQ	n.d.	121±16
ITA -3	a	a	a	a	a
BAB -1	17,36	72±29	n.d.	n.d.	93±1,5
BAB -2	19,49	64±13	n.d.	n.d.	96±6
BAB -3	14,11	126±15	36±9	51±13	101±6
GTB -1	18,20	60±11	42±4	87±13	92±17
GTB -2	21,23	<LQ	n.d.	n.d.	82±13
GTB -3	16,40	<LQ	n.d.	n.d.	75±9
PNG- 1	8,94	55±12	89±6	n.d.	83±19
PNG-2	19,32	136±9	200±17	n.d.	112±4
PNG -3	13,76	71±8	302±30	n.d.	98±16
CAN -1	14,86	n.d.	n.d.	n.d.	88±12
CAN -2a	13,96	n.d.	455	n.d.	61±18
CAN -2b	n.a.	60±12	n.d.	n.d.	104±9
CAN -3	9,60	61±10	n.d.	n.d.	68±9
STO -1	11,67	85±10	76±18	<LQ	83±8
STO -2	17,03	n.d.	272±14	n.d.	123±10
STO -3	12,87	n.d.	n.d.	n.d.	88±3
SEP -1	12,52	105±27	18±17	<LQ	95±4
SEP -2	19,32	<LQ	59±10	n.d.	101±19
SEP -3	13,58	n.d.	n.d.	n.d.	102±21
IPM -1	16,84	70±14	<LQ	n.d.	87±5
IPM -2	15,92	64±14	<LQ	n.d.	113±10
IPM -3	11,90	62±13	n.d.	n.d.	144±15

^a amostra perdida; n.a não analisado; n.d. não detectado; <LQ: abaixo do limite de quantificação;
CAN2a: *Cathorops spixii*; CAN2b: *Aspistor luniscutis*.

APÊNDICE 4

Resultados obtidos na análise de BTs nas brânquias de bagres estuarinos sem a correção pelo TPrT e a recuperação obtida para esse surrogate nas amostras.

Amostras	TBT	DBT	MBT	TPrT (%)
ITA -1	140±13	<LQ	n.d.	108±14
ITA -2	56±5	n.d.	n.d.	78±4
ITA -3 ^a				
BAB -1	n.d.	n.d.	n.d.	66±8
BAB -2	n.d.	n.d.	n.d.	70±16
BAB -3	n.d.	n.d.	n.d.	66±12
GTB -1	<LQ	n.d.	n.d.	75±8
GTB -2	<LQ	n.d.	n.d.	76±7
GTB -3	62±7	n.d.	n.d.	86±4
PNG- 1	n.d.	n.d.	n.d.	61±8
PNG-2	n.d.	13±7	135±35	80±15
PNG -3	n.d.	n.d.	n.d.	73±11
CAN -1 ^b				
CAN -2a	n.d.	n.d.	n.d.	69±18
CAN -2b	n.d.	n.d.	n.d.	86±9
CAN -3	n.d.	n.d.	n.d.	90±10
STO -1	58±15	n.d.	n.d.	98±10
STO -2	n.d.	n.d.	n.d.	93±7
STO -3	n.d.	n.d.	n.d.	91±14
SEP -1	68±26	n.d.	n.d.	83±1,4
SEP -2	n.d.	n.d.	n.d.	72±21
SEP -3	54±8	n.d.	n.d.	93±18
IPM -1	<LQ	n.d.	n.d.	86±17
IPM -2	<LQ	n.d.	n.d.	85±10
IPM -3	<LQ	n.d.	n.d.	92±11

^a amostra perdida; ^b amostra insuficiente; n.d. não detectado; <LQ: abaixo do limite de quantificação; CAN2a: *Cathorops spixii*; CAN2b: *Aspistor luniscutis*.

APÊNDICE 5

Cromatograma da amostra referente ao fígado do bagre *G. genidens* amostrado no estuário de Itajaí-SC, amostra ITA1.

Índice de correlação de Spearman ($p < 0,05$) correlacionando variáveis ambientais e BTs encontrados nos compartimentos estudados.

	TBT sed	DBT sed	MBT sed	TBT mps	DBT mps	MBT mps	TBT fig	DBT fig	MBT fig	TBT bran	DBT bran	MBT bran	M.O.	N	H	C	S	Areia	Silte	Argila	prof.	Eh ⁻	Temp.	Salin.	pH	MPS
TBT sed	1,00																									
DBT sed	0,41	1,00																								
MBT sed	0,30	0,42	1,00																							
TBT mps	-0,07	0,22	0,16	1,00																						
DBT mps	0,17	0,33	0,39	0,50	1,00																					
MBT mps	-0,03	-0,20	0,26	0,13	0,42	1,00																				
TBT fig	0,47	0,24	0,29	-0,05	0,22	0,19	1,00																			
DBT fig	0,22	0,08	0,32	0,28	0,46	0,22	0,29	1,00																		
MBT fig	0,28	-0,19	0,32	-0,24	0,09	0,36	0,42	0,51	1,00																	
TBT bran	0,33	0,44	0,13	0,11	0,49	0,11	0,23	0,03	0,10	1,00																
DBT bran	-0,19	-0,12	0,05	0,09	0,35	0,09	0,09	0,17	0,05	0,11	1,00															
MBT bran	-0,19	-0,12	0,05	0,09	0,35	0,09	0,09	0,17	0,05	0,11	1,00	1,00														
M.O.	0,29	0,27	0,13	0,03	0,12	0,15	-0,24	0,05	0,06	0,18	-0,05	-0,05	1,00													
N	0,35	0,33	0,17	0,11	0,23	0,27	-0,16	-0,12	-0,15	0,37	-0,20	-0,20	<u>0,72</u>	1,00												
H	0,41	0,20	0,16	0,09	0,22	0,12	-0,11	-0,09	-0,02	0,37	-0,11	-0,11	0,61	<u>0,71</u>	1,00											
C	0,47	0,49	0,20	0,10	0,23	0,14	-0,08	-0,03	-0,07	0,37	-0,13	-0,13	0,67	<u>0,90</u>	0,67	1,00										
S	0,26	0,44	0,31	0,30	0,41	0,19	-0,22	0,14	-0,08	0,31	-0,06	-0,06	<u>0,79</u>	<u>0,76</u>	0,62	<u>0,76</u>	1,00									
Areia	-0,27	-0,18	-0,23	0,02	-0,14	-0,18	0,24	-0,10	-0,16	-0,20	0,12	0,12	<u>-0,89</u>	<u>-0,71</u>	<u>-0,75</u>	-0,64	<u>-0,72</u>	1,00								
Silte	0,39	0,35	0,30	0,04	0,21	0,12	-0,06	0,26	0,26	0,24	-0,01	-0,01	<u>0,81</u>	<u>0,71</u>	0,68	<u>0,77</u>	<u>0,71</u>	<u>-0,89</u>	1,00							
Argila	0,24	0,19	0,18	0,00	0,11	0,11	-0,29	0,06	0,06	0,16	-0,14	-0,14	<u>0,92</u>	0,69	<u>0,71</u>	0,58	<u>0,76</u>	<u>-0,95</u>	<u>0,79</u>	1,00						
prof.	0,19	-0,21	0,12	-0,22	0,02	0,45	0,37	0,26	0,32	-0,19	0,07	0,07	0,17	0,02	-0,02	-0,03	0,09	-0,10	-0,02	0,22	1,00					
Eh ⁻	-0,20	-0,41	-0,14	-0,06	-0,26	-0,01	0,23	-0,14	0,16	-0,34	0,18	0,18	<u>-0,71</u>	-0,56	-0,42	-0,44	<u>-0,74</u>	0,61	-0,52	-0,70	-0,04	1,00				
Temp.	-0,17	-0,04	-0,18	-0,21	-0,24	-0,01	-0,25	-0,45	-0,18	0,19	-0,35	-0,35	0,11	0,31	0,32	0,07	0,02	-0,27	0,12	0,22	-0,44	-0,13	1,00			
Salin.	-0,04	-0,19	0,08	0,31	0,32	0,42	0,20	0,24	-0,05	-0,18	0,00	0,00	0,01	-0,04	-0,26	-0,16	0,10	0,15	-0,24	-0,07	0,52	-0,18	-0,52	1,00		
pH	-0,05	0,06	0,23	0,15	0,50	0,26	-0,02	0,25	-0,07	0,18	0,26	0,26	-0,08	0,04	-0,25	0,02	0,17	0,24	-0,21	-0,11	0,37	-0,24	-0,57	0,59	1,00	
MPS	0,00	-0,36	0,12	-0,24	0,03	0,55	0,26	0,01	0,43	0,03	-0,03	-0,03	0,05	0,00	0,02	-0,15	-0,01	-0,18	0,08	0,10	0,31	0,02	0,21	0,20	-0,13	1,00

Em **negrito**: correlação moderadamente significativa; sublinhado: correlação fortemente significativa.

APÊNDICE 7

Classificação (%) dos fatores na distribuição das variáveis explicada através da Análise de Componentes Principais (PCA) obtida na análise de BTs e biomarcadores em *C. spixii* amostrado em Paranaguá-PR.