

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



**TESE DE DOUTORADO**

**Impactos e tendências do uso de tintas anti-incrustantes na  
América do Sul**

**ÍTALO BRAGA DE CASTRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Oceanografia Física, Química e Geológica.

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Fillmann**

Rio Grande, Maio de 2011

# **Impactos e tendências do uso de tintas anti-incrustantes na América do Sul**

**ÍTALO BRAGA DE CASTRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Oceanografia Física, Química e Geológica.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gilberto Fillmann (FURG - Presidente)

Prof. Dr. Gregório Bigatti (CENPAT-Argentina)

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandez (UERJ)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)

Prof. Dr. Grasiela Lopes Pinho (FURG)

Prof. Dr. Luis Felipe Hax Niencheski (FURG)

*...Dedico este trabalho aquele que tornou o sonho possível e  
me deixou voar... Prof. Dr. Gilberto Fillmann*

*“Na paisagem multidimensional de todas as realizações científicas possíveis, as verdadeiras descobertas são ilhas de viabilidade, separadas de outras ilhas por gigantescos oceanos de deformidades grotescas. A partir de qualquer ilha, pode-se evoluir um passo por vez... Essa evolução é uma trajetória no espaço multidimensional na qual cada passo do caminho tem que representar um avanço em relação ao seu predecessor” (Traduzido e Adaptado do livro *Ancestor’s Tale*, Richard Dawkins)*

*“Em minha caminhada, parei muitas vezes para olhar belezas naturais, e tentei fixar para sempre em minha mente uma impressão que naqueles momentos, eu sabia que cedo ou tarde deveria desaparecer. Essas belezas permanecerão claras e separadas em minha mente, mas as mil belezas que as unem em uma única cena perfeita deverão perecer: no entanto elas viverão, como uma história ouvida na infância, um quadro cheio de figuras indistintas, mas muito bonitas.” (Traduzido e Adaptado de uma carta escrita por Charles Darwin ao deixar o litoral brasileiro em 1836)*

## AGRADECIMENTOS

Durante o período em que me dediquei à produção deste trabalho, pude desfrutar do inestimável apoio de um grande número de pessoas. Não pretendo aqui saldar minhas dívidas de gratidão. Meu objetivo é mais modesto! Desejo apenas deixar registrado um justo agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram nessa jornada.

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Gilberto Fillmann, pela confiança, pelo apoio, pela paciência, pela amizade, por me ensinar coisas que orientador nenhum ensina, por me proporcionar oportunidades com as quais eu jamais havia sonhado e sobretudo por me conduzir sabiamente pelo caminho que levou a conclusão desta tese.

A meu orientador de doutorado sanduiche, Dr. Gregório Bigatti por ter compartilhado seus conhecimentos com nosso grupo de pesquisa e por ter proporcionado todo apoio necessário durante a realização do meu estágio em Puerto Madryn. Esse agradecimento é extensivo ao seu grupo: Andrés Averbuj, Monica Prismot, Federico Del Brio, Marta Commendatore e Marcos Franco.

A pequena notável, Prof. Dra. Grasiela Pinho, por me colocar de volta no caminho sempre que me desviei, pela amizade, pela parceria, pelas críticas e sugestões construtivas.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel, por me auxiliar nos meus primeiros passos pelo universo da química analítica e da cromatografia como ferramenta importantíssima para conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio dos Santos Fernandez (Halley), pela amizade, por me acompanhar de perto ao longo de toda a minha formação e pelas orientações preciosas transmitidas a mim com muita paciência através de horas ao telefone ou de emails enormes.

A minha primeira orientanda de mestrado, Maria Fernanda Arroyo, coautora do artigo “Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador” que figura no capítulo IV desse trabalho, por ter tido a coragem de encarar o desafio de fazer ciência no Equador sob a tutela de um jovem sonhador. Aproveito aqui para registrar também meu agradecimento a Universidade de

Guayaquil que proporcionou à infra-estrutura necessária a realização das etapas de campo do trabalho.

Ao pesquisador Msc. Fernando César Perina, pela amizade, pelos momentos de descontração e pela inestimável contribuição a revisão bibliográfica de compostos orgânicos de estanho presente no capítulo I deste trabalho.

A Mestranda Eliete Westphal, pelo apoio na elaboração da revisão bibliográfica sobre anti-incrustantes de terceira geração apresentada como parte do capítulo I da presente tese.

A Dra. Patrícia Gomes Costa, pela parceria e empenho durante todo o processo de validação da metodologia analítica para determinação de organoestânicos por cromatografia a gás bem como nas análises e interpretação de todas as amostras analisadas durante este estudo.

A Oceanóloga Martina Rossato, pela efetiva participação em todas as etapas da realização do artigo que compõe o capítulo VI desta tese.

Ao professor Dr. Marcelo D'Oca, pelas preciosas sugestões dadas para realização das reações de derivatização em atmosfera inerte de nitrogênio.

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Hax Niencheski por ter contribuído com conselhos importantes a minha formação durante a participação em minha banca de qualificação e, sobretudo por ser uma fonte perene de inspiração a qualquer jovem pesquisador.

A Profa. Dra. Mônica Wollner Kersanach pelas sugestões dadas durante a participação em minha banca de qualificação e auxílio durante as determinações de Carbono Orgânico nas amostras de sedimentos. Estendo aqui esses agradecimentos a sua equipe: Luiza Dy e Regina Casartelli

Ao servidor Nilson Maurente, pela ajuda, pela orientação e, sobretudo pela paciência em me ensinar os mais básicos detalhes de um laboratório de química, os quais eu desconhecia ao iniciar essa jornada.

A Dra. Juliana Leonel pela revisão ortográfica do capítulo V deste trabalho e por acalmar meu ânimo exaltado nos momentos de desespero.

A todo o pessoal do CONECO: Aline Sartório, Micheli Pieroni, Luciara, Paula Tourinho, Gabriela Ignácio, Thiago Lorente, Melissa, Samile Saber, Marileni, Luís Domingues, Gabriela Kolb, Fernanda Poleza e Rafael Camargo que sempre se esforçaram para me ajudar em tudo o que precisei.

Ao pessoal do Centro de Estudos do Mar da UFPR, pelo apoio logístico fornecido durante duas campanhas de amostragem realizadas na Baía de Paranaguá.

A coordenação do Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, nas pessoas dos Professores Drs. João Sarkis Yunes e Maurício da Mata, e do servidor Claubisnei, os quais estiveram sempre disponíveis a me auxiliar nas mais diversas situações.

A minha sogra Vilma Maria Cavalcante por ser minha segunda mãe e por ter nos apoiado apesar das saudades que eu sei que ela sentiu.

A minha mãe, Maria Carmelita Braga (*in memorium*) por ter me ensinado a maior das lições e acreditado que eu seria capaz. Infelizmente ela não teve tempo de esperar por esse momento.

Finalmente gostaria de registrar aqui o mais sincero agradecimento a Anna Rafaela Cavalcante Braga (minha esposa) e a Thaís Cavalcante Braga (minha filha). Juntas elas sofreram e comemoraram comigo a cada momento da jornada. A contribuição delas a esse trabalho e a minha formação não pode ser quantificada por nenhum tipo de variável. Elas são o combustível que me impulsiona.

# SUMÁRIO

## AGRADECIMENTOS

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL: .....</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESE: .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVO GERAL: .....</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos Específicos: .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>18</b>
<b>Organotin contamination in South America coastal areas.....</b>	<b>19</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>19</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>20</b>
<b>OTs contamination in abiotic matrices.....</b>	<b>22</b>
<b>OTs in Marine Mammals.....</b>	<b>31</b>
<b>Imposex in the South American coast.....</b>	<b>33</b>
Imposex in the Brazilian coast .....	36
Imposex in the Argentinean coast .....	37
Imposex in other South American coastal areas.....	38
<b>Legislation .....</b>	<b>38</b>
<b>Future trends .....</b>	<b>41</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>43</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>44</b>
<b>Refererences.....</b>	<b>44</b>
<b>Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático .....</b>	<b>52</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>52</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>53</b>
<b>Biocidas não Metálicos:.....</b>	<b>57</b>
Irgarol 1051 .....	57
Diuron .....	62
DCOIT (Sea Nine 211) .....	63
Clorotalonil .....	65
Diclofluanida.....	66
Tiram.....	68
TCMTB (Busan) .....	69
TCMS Piridina (Densil).....	71
Trifenilborano Piridina (TPBP).....	71
<b>Biocidas metálicos: .....</b>	<b>73</b>
Piritionas metálicas: .....	73
Ziram.....	75
Maneb .....	76
Biocidas à base de cobre .....	77



<b>Considerações Finais</b> .....	<b>78</b>
Características ideais de um anti-incrustante .....	79
Avaliações Ecotoxicológicas.....	79
Determinações analíticas.....	81
Perspectivas Futuras.....	81
Recomendações Finais .....	82
<b>Referências</b> .....	<b>83</b>
<b><i>CAPÍTULO II – Avaliação Preliminar</i></b> .....	<b>87</b>
<b>Preliminary appraisal of imposex in areas under the influence of Southern Brazilian harbors</b> .....	<b>88</b>
Abstract .....	88
Resumo .....	88
Introduction .....	89
Materials And Methods .....	90
Results .....	91
Discussion .....	94
Acknowledgments.....	98
References .....	98
<b><i>CAPÍTULO III – Validação de Métodos</i></b> .....	<b>102</b>
<b>Effect of environmental matrices in butyltin determinations by GC/MS</b> .....	<b>103</b>
Abstract .....	103
Introduction .....	104
Experimental.....	106
Chemicals.....	106
Instrument .....	107
Extraction.....	108
Method validation .....	109
Analytical Curves, linearity and matrix effect study.....	110
Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) .....	110
Precision and Accuracy.....	110
<b>Results and discussion</b> .....	<b>111</b>
<b>Validation</b> .....	<b>113</b>
Analytical curves, linearity, matrix effect study, LOD and LOQ .....	113
Precision and Accuracy.....	115
<b>Conclusions</b> .....	<b>117</b>
<b>Acknowledgments</b> .....	<b>117</b>
<b>References</b> .....	<b>118</b>
<b><i>CAPÍTULO IV – Contaminação por COE na Costa Oeste da América do Sul</i></b> .....	<b>122</b>
<b>Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador</b> .....	<b>123</b>
Abstract .....	123
Introduction .....	124
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>126</b>
Samples .....	126
Sediment Characterization .....	127
Butyltin analysis.....	127
Imposex determination.....	129
Statistical analysis .....	130
<b>Results and Discussion</b> .....	<b>130</b>

Granulometry and total organic carbon.....	130
Butyltin contamination in sediment .....	131
Imposex levels.....	134
Data Integration.....	137
<b>Conclusions .....</b>	<b>139</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>140</b>
<b>References .....</b>	<b>140</b>
<b>High TBT and imposex levels in commercial muricid <i>Thais chocolata</i> from two Peruvian harbor areas .....</b>	<b>145</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>145</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>146</b>
<b>Materials and Methods .....</b>	<b>147</b>
Study area and Samples .....	147
Butyltin analysis.....	149
Statistical analysis .....	150
<b>Results and Discussion .....</b>	<b>151</b>
Imposex levels.....	151
<b>Conclusions .....</b>	<b>159</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>159</b>
<b>References .....</b>	<b>160</b>
<b>CAPÍTULO V - Redução dos níveis de imposex no Sul do Brasil.....</b>	<b>165</b>
<b>Imposex reduction and reminiscent butyltin contamination in Southern Brazilian harbors .....</b>	<b>166</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>167</b>
<b>Materials and Methods .....</b>	<b>168</b>
Sampling .....	168
Imposex determination.....	170
Female OTs body burdens .....	170
Statistical analysis .....	171
<b>Results .....</b>	<b>172</b>
Imposex Determination.....	172
Female OTs body burdens .....	176
<b>Discussion .....</b>	<b>177</b>
<b>Acknowledgments.....</b>	<b>182</b>
<b>References .....</b>	<b>183</b>
<b>CAPÍTULO VI - COE, Irgarol e Diuron em áreas costeiras da América do Sul .....</b>	<b>187</b>
<b>Irgarol, Diuron e Butilestânicos em zonas costeiras da América do Sul.....</b>	<b>188</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>188</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>189</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>191</b>
Áreas de estudo .....	191
Golfo de Guayaquil (Equador).....	191
Estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) .....	191
Golfo Nuevo (Argentina).....	192
Obtenção das Amostras.....	192
Caracterização dos Sedimentos.....	192
Análise dos compostos butilestânicos .....	193
Análises de Irgarol e Diuron .....	195
Análises estatísticas.....	196

<b>Resultados .....</b>	<b>196</b>
Golfo de Guayaquil (Equador).....	198
Estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) .....	199
Golfo Nuevo (Argentina).....	202
<b>Discussão .....</b>	<b>203</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>208</b>
<b>Referências .....</b>	<b>209</b>
<b><i>DISCUSSÃO GERAL.....</i></b>	<b>213</b>
<b><i>CONCLUSÕES GERAIS .....</i></b>	<b>223</b>
<b><i>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</i></b>	<b>225</b>
<b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i></b>	<b>227</b>
<b><i>ANEXOS.....</i></b>	<b>232</b>
<b>CROMATOGRAMAS.....</b>	<b>232</b>
<b>CURVAS ANALÍTICAS .....</b>	<b>234</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (em português) .....</b>	<b>235</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (em inglês) .....</b>	<b>237</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>239</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>241</b>
<b>PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO:.....</b>	<b>243</b>

## RESUMO

Uma visão geral da problemática relacionada ao uso de tintas anti-incrustantes de segunda e terceira gerações na América do Sul é apresentada no presente trabalho. Para tanto, foram inicialmente realizadas revisões sobre o tema e, posteriormente, delineados objetivos visando preencher as lacunas de conhecimento identificadas. Como resultados, verificou-se que a costa da América do Sul encontra-se atualmente impactada de forma difusa pela utilização de tintas anti-incrustantes contendo TBT, sendo os terminais portuários, as marinas e os estaleiros localizados ao longo do litoral as principais fontes desse composto para o ambiente, visto que a ocorrência de imposex em populações de gastrópodes está intimamente relacionada a essas áreas. Adicionalmente, a baía de Paranaguá (Brasil), baía de Guanabara (Brasil), região portuária de Mar del Plata (Argentina), Bahía Blanca (Argentina), Puerto Deseado (Argentina), baía de São Vicente (Chile), e região portuária de Callao (Perú) foram identificados como “*hot spots*” da contaminação por COE na América do Sul. Porém, os níveis desses compostos, bem como o impacto produzido pelo seu uso continuam desconhecidos para zonas costeiras da Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Uruguai e norte do Chile. Com relação aos níveis de biocidas de segunda e terceira gerações detectados em sedimentos, verificou-se que o Golfo de Guayaquil (Equador), Golfo Novo (Argentina) e estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) encontram-se moderadamente impactados pela contaminação por TBT oriundo de sistemas anti-incrustantes, havendo, entretanto, indícios de aportes antigos, ou de uma rápida degradação de TBT, associados a aportes recentes menos expressivos, o que indicaria uma possível tendência geral de redução para os sistemas aquáticos sul-americanos. Além disso, irgarol e diuron não parecem ser os biocidas preferenciais presentes nos novos sistemas anti-incrustantes que substituem as tintas de segunda geração na América do Sul. Sendo assim, os níveis ambientais de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração permanecem desconhecidos para toda a costa da América do Sul. Finalmente, com base no conhecimento adquirido é possível afirmar que as áreas atualmente impactadas por COE serão provavelmente as mesmas áreas que futuramente serão afetadas pelos biocidas utilizados em anti-incrustantes de terceira geração.

**Palavras-Chave:** Organoestânicos, imposex, portos, contaminação, tintas anti-incrustantes.

## ABSTRACT

An overview on the problems related to antifouling paints of second and third generations in coastal areas of South America is presented in the current work. Initially, this subject was reviewed and then some studies specifically addressed the main deficiencies in knowledge. In conclusion, South American coast areas can be considered as diffusely impacted by the use of TBT-based antifouling paints. Harbor terminals, marinas and shipyards were identified as the main sources of this contamination, since the imposex occurrence in gastropod populations is closely related to those areas. Additionally, "hot spots" for BT contamination were identified at Paranaguá bay (Brazil), Guanabara bay (Brazil), Mar del Plata harbor (Argentina), Bahía Blanca (Argentina), Puerto Deseado (Argentina), San Vicente bay (Chile) and Callao harbor area (Peru). However, there is still no information about BT levels and imposex for the coastal areas of Colombia, Venezuela, Suriname, French Guiana, Guyana, Uruguay and northern Chile. Based on the present study about second and third generation anti-fouling biocides, the estuarine areas of Gulf of Guayaquil (Ecuador), Gulf Nuevo (Argentina) and the Patos Lagoon estuary (Brazil) can be considered as moderately contaminated by TBT. Even so, the degradation indexes and less intense recent contributions of TBT are indicating a possible general decreasing trend for South American aquatic systems. Furthermore, diuron and irgarol are probably not the preferred biocides used in new anti-fouling paints at South America. Thus, environmental levels of booster biocides used in third generation antifouling paints remain unknown for the South America coast. Finally, based on the information gathered so far, it is possible to state that the very same areas currently impacted by BTs would be the ones affected by the booster biocides used in third generation antifouling paints.

**Keywords:** Organotin, imposex, harbors, contamination, antifouling paints.

## **INTRODUÇÃO GERAL:**

Vários são os grupos de compostos químicos que apresentam potencial impactante para o ambiente. Estima-se que mais de 70.000 compostos orgânicos sintéticos diferentes sejam utilizados atualmente nos mais diversos bens de consumo (Schwarzenbach *et al.*, 1994). Dentre os contaminantes orgânicos danosos a ecossistemas, os biocidas utilizados como princípio ativo de tintas anti-incrustantes tem sido motivo de preocupação nas últimas décadas (Readman, 2006a). A utilização de tintas anti-incrustantes é mandatória para embarcações e outras estruturas expostas ao contato direto e prolongado com a água do mar. Sem essas tintas, processos de corrosão são acelerados, atividades de manutenção são mais frequentemente necessárias, ocorre à produção de um maior volume de resíduos e o consumo de combustível é incrementado em função do aumento no atrito provocado entre o casco da embarcação e a água. Adicionalmente, todos esses processos geram um aumento dos custos do transporte marítimo (Kotrikla, 2009).

Em geral tintas anti-incrustantes incorporam em sua composição biocidas que evitam que os organismos formadores das comunidades incrustantes (*fouling*) consigam se estabelecer sobre a superfície revestida (Almeida *et al.*, 2007). Esses biocidas, por sua vez, são liberados das pinturas provocando danos aos ecossistemas aquáticos, principalmente nas regiões onde se observa um grande fluxo de embarcações (Readman, 2006a). Sendo assim, áreas costeiras sob a influência de portos, marinas e estaleiros estão entre as mais susceptíveis a esse tipo de contaminação (Sonak *et al.*, 2009).

A utilização de estratégias com objetivo de minimizar a incrustação em cascos de embarcações teve início ainda na antiguidade. Entretanto, a utilização de tintas para tal

finalidade é mais recente, sendo que os primeiros registros conhecidos datam da metade do XIX (Yebra *et al.*, 2004a). Essas primeiras tintas utilizavam óxido de cobre e/ou zinco como agentes biocidas sendo, atualmente, conhecidas como anti-incrustantes de primeira geração (Fernandez & Pinheiro, 2007). Porém, a partir do início da década de 1960 uma segunda geração de tintas anti-incrustantes passou a ser utilizada. Essas novas tintas, a base de organoestânicos (COE) como o TBT (tributilestanho) e o TPT (trifenilestanho), apresentavam uma durabilidade muito superior quando comparadas aos produtos anteriormente utilizados (Fent, 2003). Devido a sua elevada eficiência, tintas a base de COE passaram rapidamente a ser utilizadas pelos maiores estaleiros do mundo, chegando a revestir 70% de toda frota mercante mundial durante a década de 1980 (Ludgate, 1987).

Apesar da grande eficiência das tintas anti-incrustantes de segunda geração, uma série de problemas relacionados à sua elevada toxicidade ambiental surgiu já na década de 80 (Gipperth, 2009). Esses problemas levaram a Organização Marítima Internacional (IMO) a propor o banimento mundial dessas tintas no ano de 2003. Entretanto, tal proibição somente entrou em vigor a partir de setembro de 2008 (Almeida *et al.*, 2007).

Em resposta a demanda causada pela regulamentação imposta às tintas a base de TBT, a indústria naval lançou no mercado uma terceira geração de tintas anti-incrustantes. Estas tintas utilizam compostos metálicos e orgânicos de forma concomitante a fim de intensificar a sua atividade biocida (Almeida *et al.*, 2007). A utilização desses novos produtos foi homologada pela IMO após a proposição do banimento mundial do TBT (Okamura & Mieno, 2006b). Os principais compostos atualmente usados em tintas anti-incrustantes são: Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine, Clorotalonil, Diclofluanida, Tiram, Busan (TCMTB), TCMS Piridina, Trifenilbornano Piridina, Zinco Piritona, Cobre Piritona, Ziram, Maneb, Óxido Cuproso, Tiocianato de Cobre e Naftenato de Cobre (Yebra *et al.*, 2004b).

Os produtos mais utilizados imediatamente após a proibição imposta ao TBT foram os herbicidas Irgarol 1051 e Diuron. Porém, elevadas concentrações foram encontradas durante monitoramentos ambientais realizados na Europa, Ásia e América do Norte alguns anos após o início da sua utilização (Konstantinou & Albanis, 2004). Em função disso, alguns países como Inglaterra, França e Noruega já adotam medidas restritivas quanto a sua utilização (Readman, 2006b).

Na América do Sul, entretanto, poucos são os estudos disponíveis sobre o assunto, o que resultou em uma quase inexistência de legislações ambientais que abranjam compostos utilizados como biocidas em tintas anti-incrustantes. Exceções feitas à proibição de uso nos navios da marinha brasileira (Fernandez, 2006), a resolução CONAMA 357/2005 do Brasil, a qual estabelece limites apenas para o tributilestanho em água (CONAMA, 2005), à Norma da Autoridade Marítima Brasileira para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações (NORMAM/23), que estabeleceu a partir do ano de 2007 procedimentos para remoção e repintura de embarcações que utilizavam anti-incrustantes de segunda geração (NORMAM/23, 2007) e à Norma da Prefeitura Naval Argentina, que proibiu a utilização de tintas à base de TBT em todos os tipos de embarcações a partir de 1998 (DPMA, 1998).

Sendo assim, uma visão geral da problemática relacionada ao uso de tintas anti-incrustantes de segunda e terceira gerações na América do Sul é apresentada neste trabalho. Para tanto, foram inicialmente identificadas as lacunas de conhecimento presentes com relação ao tema, e posteriormente delineados objetivos de modo a apresentar um panorama atual, bem como as tendências desse impacto nas zonas costeiras sul-americanas. Dessa forma, o presente trabalho foi subdividido em 6 capítulos, compostos por 1 ou 2 artigos científicos cada, que visam cumprir com os objetivos específicos descritos adiante.



## **HIPÓTESE:**

O impacto ambiental causado pelo uso de tintas anti-incrustantes de segunda geração é um problema amplamente difundido pela região costeira da América do Sul. Entretanto, a expectativa de diminuição dos níveis ambientais do TBT após o seu banimento mundial depende das particularidades de cada localidade, como o nível das restrições e usos atuais, assim como das suas condições oceanográficas específicas.

## **OBJETIVO GERAL:**

Avaliar a situação atual e as tendências do impacto produzido pelo uso de anti-incrustantes na América do Sul após o banimento mundial dos compostos orgânicos de estanho.

## **Objetivos Específicos:**

- 1- Realizar um levantamento dos dados disponíveis sobre o impacto produzido pelo uso de tintas anti-incrustantes a base de organoestânicos em áreas portuárias, marinas e estaleiros da América do Sul, bem como fazer uma revisão sobre as propriedades químicas, ocorrência ambiental, ecotoxicologia e técnicas de análise relacionadas a biocidas usados em anti-incrustantes de terceira geração;
- 2- Avaliar preliminarmente os níveis de imposex nas áreas sob a influência dos principais terminais portuários do Sul do Brasil (Paranaguá (PR), São Francisco do Sul (SC), Itajaí (SC) e Rio Grande (RS), antes do completo banimento das tintas a base de organoestânicos;
- 3- Otimizar e validar métodos analíticos para determinação de COE em diferentes matrizes ambientais;

- 4- Determinar a situação atual da contaminação advinda do uso de tintas anti-incrustantes de segunda geração em outras áreas susceptíveis, porém ainda não estudadas, da América do Sul;
- 5- Verificar a ocorrência de imposex e níveis de contaminação por COE nas áreas sob a influência dos terminais portuários de Paranaguá (PR), São Francisco do Sul (SC), Itajaí (SC) e Rio Grande (RS) após o banimento internacional das tintas anti-incrustantes de segunda geração;
- 6- Verificar os níveis de contaminação por COE e por alguns biocidas de terceira geração em áreas sob a influência dos terminais portuários de Rio Grande (Brasil), do Golfo de Guayaquil (Equador) e do Golfo Nuevo (Puerto Madryn, Argentina).

## **CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica**

Esse capítulo é composto por dois artigos científicos que objetivam revisar as informações disponíveis na literatura sobre anti-incrustantes de segunda e terceira gerações. O primeiro artigo, intitulado “*Review of organotins contamination in South American coastal areas*”, encontra-se atualmente aceito para publicação no periódico “*Environmental Monitoring and Assessment*” da editora Springer. Este artigo compila toda a informação publicada sobre a ocorrência ambiental, seu principal efeito (imposex) e legislação relacionada aos organoestânicos na América do Sul. O segundo artigo discute a ocorrência ambiental, propriedades químicas, ecotoxicologia e métodos de análise para os 16 biocidas homologados pela IMO para utilização em tintas anti-incrustantes de terceira geração. Este artigo encontra-se aceito para publicação no periódico Química Nova e tem como título, “*Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático*”.

## **Organotin contamination in South America coastal areas**

Ítalo Braga de Castro\*, Fernando Cesar Perina and Gilberto Fillmann

Laboratório de microcontaminantes orgânicos e ecotoxicologia aquática - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS-Brazil

\*Corresponding author: phone: + 55 53 3233-6866; fax : +55 53 3233-6738; E-mail address: [italobraga@gmail.com](mailto:italobraga@gmail.com)

### **Abstract**

Organotin compounds (OTs) were used in antifouling paints for more than four decades. However, due to their widespread intensive use and high toxicity, undesirable effects in non-target marine organisms have been detected since the early 80's. Consequently, International Maritime Organization banned new maritime applications of these products in January 1<sup>st</sup>, 2003 and their presence on ship hulls from January 1<sup>st</sup>, 2008. Although extensively studied in Europe, North America, Oceania, and Asia, environmental levels and effects of organotin contamination are still poorly known for South America. Thus, the current review aimed to present the actual status of this problem in South America by summarizing and comparing the available data in the literature. An overview of the OTs concentrations in sediment and biota and their effects, mainly imposex in marine gastropods, are presented. This work showed that in Atlantic coastal areas of South America there are "hot spots" of OTs contamination, similar to that observed in industrialized countries of Northern Hemisphere. On the other hand, the number of accomplished studies in the Pacific coast is extremely low. Despite the limitation on studies about OTs environmental levels and their related effects, the available data pointed out for a widespread TBT contamination along the South American coastal areas. Therefore, the establishment of baselines of organotin contamination in the Pacific coast and the implementation of temporal trend studies in the South American coastal areas is crucial to verify the effectiveness of local regulations and OTs global ban, and to map the most sensitive areas related to present and future antifouling impacts.

**Keywords:** TBT, South-America, contamination, environment, review

## Introduction

Antifouling paints have been used in structures exposed directly to seawater, including hulls of ships, aquaculture nets, offshore structures, and ducts (Champ 2000). According to Kotrila (2009) the purpose of using antifouling paints are: i) decreased frictional resistance between water and ship hulls, reducing fuel consumption; ii) decreased frequency of dry-docking, which results in lost of time and increase in maintenance costs; iii) reduction of ship hull corrosion and minimizing the introduction of non-native species in the marine environments. Before the emergence of TBT-based antifouling paints, the world fleet had used paints containing copper or zinc oxides, which, however, had low durability (12 months) (Almeida et al. 2007; Godoi et al. 2003a). Hence, more efficient antifouling paints became necessary.

Organotins compounds (OTs), particularly tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPhT), have been used for several purposes for a long period of time. The industrial applications of OTs have been known since the 20's, when they were used as fluid in transformers and capacitors. Their biocides properties were discovered by the International Council of Researches on Paints during the 50's, thereafter these compounds were commercially used in fungicides, acaricides, and other pesticides. In the elapsing 60's, the OTs were widely used on many other products, such as stabilizers in the production of polyvinyl chloride and catalysts for several industrial processes. The use of organotin as active ingredient in antifouling paints have began in the 60's (Clark et al. 1988; Godoi et al. 2003a), but became common in the 70's (Almeida et al. 2007; Yebra et al. 2004).

The first antifouling paint based on organotin have simply mixed TBT to the paint (technology of soluble matrix), providing a very quick initial biocide release. However, these products were effective for up to 15 months (Almeida et al. 2007). Afterwards, TBT was used in self-polishing-paints, compatible with steel and aluminum hulls. Such paints

were based on acrylic copolymer with TBT groups bonded to the main polymer chain by ester bonds, in which the polymer is soluble in sea-water. Since the dissolution can be controlled at a molecular level, it is possible to obtain a well-known self-polishing effect in that paint. As a result, these paints supplied an effectiveness of up to 7 years, releasing about  $4\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$  of TBT in the seawater (Swennen et al. 1997). Due to its efficiency, in 1999 approximately 70% of all commercial shipping was protected by TBT-based paints, achieving direct savings of close to US\$ 2,400 million a year in fuel and other costs (Almeida et al. 2007; Clark et al. 1988). Estimates showed that approximately 50,000 tons of organotin compounds were produced per year between 1990 and 2003 (Godoi et al. 2003a).

Due to its intensive use, several environmental problems involving organotin and undesirable effects in non-target marine organisms have appeared at the beginning of the 80's. The first environmental damage related to antifouling TBT-based paints was reported in oyster cultures (*Crassostrea gigas*) from Arcachon bay, France. This study observed that TBT caused decrease in the number of juveniles recently fixed, and induced abnormalities in the larvae and shell malformations ("balling") in adults (Alzieu et al. 1986; Dyrzynda 1992). Studies in cultivations of *Mitillus edulis* (Beaumont and Budd 1984), *Pecten maximus* (Davies et al. 1997; Davies et al. 1987; Paul and Davies 1986), *Perna viridis* (Kan-Atireklap et al. 1997) and the gastropod *Chorus giganteus* (Gooding et al. 1999) around the world have also reported pernicious effects related to TBT exposure. For the most, it has caused growth inhibition and increasing mortality rates during cultivations. Other environmental deleterious effects of organotin compounds have been reported worldwide, including imposex and population decline in gastropods, and immunosuppressant effects in marine mammals (Alzieu et al. 1986; Bryan et al. 1986; Beaumont and Budd 1984; Kannan et al. 1997). In fact, several other studies have reported

harmful effects related to the environmental contamination by organotin in Europe (Barroso et al. 2000), North America (Evans et al. 2001), South America (Limaverde et al. 2007; Fernandez et al. 2005), Asia (Sudaryanto et al. 2000), and Oceania (Kannan et al. 1995; Wilson et al. 1993).

As a result of those environmental problems, since 1987 TBT-based antifouling paints have been restricted in many countries (Champ 2000), and in September of 2008, they were banned through the Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems on Ships adopted by International Maritime Organization (IMO 2008). However, it is well known that TBT-based antifouling paints are still widely used in several (mainly developing) countries (Shi et al. 2005). Specifically for South America, Bigatti et al. (2009) have mentioned the actual use of TBT-based antifouling paints in Argentina. The situation is not very different for the Brazilian coastal areas, where antifouling paints are still using TBT in formulations. Since pure TBT oxide and chloride are freely produced and marketed in Brazil (CESBRA 2011), different formulations are been prepared mainly by amateurs such as fisherman's and owners of recreational boats in small shipyards and private marinas.

Therefore, the current review aimed to assess the actual status of environmental organotin impact in South America based on the data available in the literature. An overview of the OTs concentrations in sediment and biota and their effects, mainly imposex in marine gastropods, throughout coastal areas of South America was presented and compared with worldwide results.

### **OTs contamination in abiotic matrices**

Once released into the water from an antifouling coating, OTs are rapidly absorbed by organisms such as bacteria and algae, or adsorbed to suspended particles or dissolved organic matter (Gadd 2000; Konstantinou and Albanis 2004). Under favorable conditions,

OTs may degrade through successive dealkylation producing dibutyltin or diphenyltin (DBT or DPhT), monobutyltin or monophenyltin (MBT or MPhT), and, ultimately, inorganic tin and becoming progressively less toxic in the process (Watanabe et al. 1992). The degradation of OTs through dealkylation to tin occurs via biotic and abiotic reactions (Maguire 1984). This mechanism of degradation is accelerated by UV radiation, increasing temperature, and biological activity, the latter being of greater importance (Clark et al. 1988). However, the biotic mechanism of OTs degradation is still not well understood (Gadd 2000).

In oxidized sediments, OTs degradation occurs within a few weeks (Clark et al. 1988), whereas in cold and anoxic environments is significantly slower, ranging from 2 years to decades (Dowson et al. 1996; Clark et al. 1988; Mora and Phillips 1997). In those circumstances, the sediments (mainly the anoxic ones) can act as reservoirs of OTs and, due to their high affinity of to particulate matter, act also as a source of these compounds back to the water column following processes (physical and/or biological) of remobilization (Axiak et al. 2000; Hallers-Tjabbes et al. 2003). Since anoxic sediments are predominant in areas with limited circulation (i.e. bays or estuaries) (Michaud and Pelletier 2006), the very same area where ship activities are more intense, the processes involved in degradation and remobilization of OTs must be better understood to further assess the extent and intensity of contamination.

Organotin residues were recently detected in sediments from several areas associated to ship traffic in Europe (Chiavarini et al. 2003a; Nogueira et al. 2003; Díez et al. 2006; Díez et al. 2002), Asia (Harino et al. 2007; Nhan et al. 2005), Oceania (Haynes and Loong 2002) and North America (Landmeyer et al. 2004). In South America, 10 studies determined organotins in sediments from 25 different sites associated to maritime activities (Figure 1). The highest butyltin concentrations detected in surface sediments of



South America ranged from a few (Todos os Santos bay, Brazil) to 6,500 ng Sn g<sup>-1</sup> (Mar del Plata, Argentina), which are comparable to other worldwide determinations (Figure 2).

Regarding the studies in South America, just one determined butyltins (BTs) in the Pacific coast. A recent work determined BTs concentrations in surface sediments of 7 sites in San Vicente bay (central Chile) (Pinochet et al. 2009). TBT, DBT and MBT values ranged from 14 to 1,560, < 20 to 1,170 and < 27 to 470 ng Sn g<sup>-1</sup> dw, respectively, while the highest concentrations were found close to the local harbor.



Figure 1: Areas assessed for imposex in gastropods (▽) and, organotin contamination in sediments (—) and marine mammals (▲) of the South American coast.

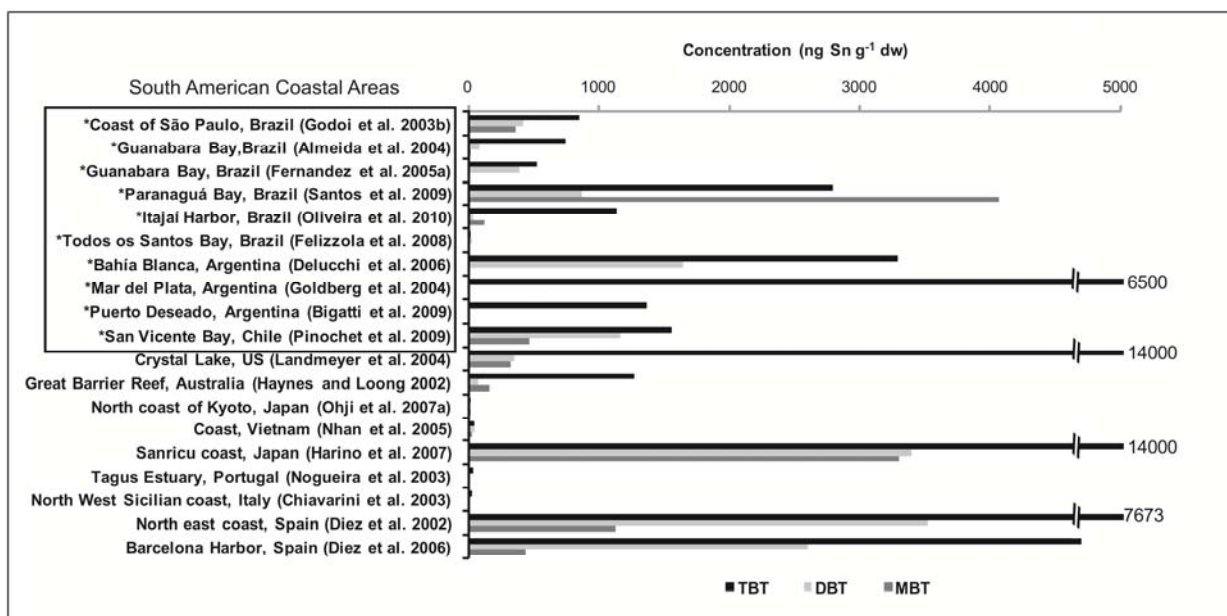


Figure 2: Highest butyltin concentrations (ng Sn g<sup>-1</sup> dw) detected in surface sediments of South America in comparison to other worldwide determinations.

In the Atlantic coast, Delucchi et al. (2006) analyzed six surface sediments (Villarino Viejo, Puerto Cuatrenos, Maldonado, Puerto Galvan, Puerto Ingeniero, and Puerto Belgrano) at Blanca Bay estuary (Argentina) and found a wide range of TBT (ranging from < 1.1 to 3,227 ng Sn g<sup>-1</sup> dw) and DBT (ranging from < 0.2 to 1,645 ng Sn g<sup>-1</sup> dw) levels. Puerto Galvan presented the highest values of TBT in the inner zone of the estuary, which is the most active harbor in the area. The results of this research suggested an intensive use of TBT-based antifouling paints on ships that navigated along the estuary. Additionally, the authors stated that ships careenage in dry docks inside the estuary may be one of the main source of TBT to local sediments.

High TBT concentrations were detected in water and sediments of 12 sites from Mar del Plata and Mar Chiquita (Argentina) (Goldberg et al. 2004). This study presented one of the highest TBT concentrations found so far for sediments (ranging from < 80 to 6,500 ng Sn g<sup>-1</sup> dw) and water (ranging from < 80 to 8,000 ng Sn L<sup>-1</sup>) of South America.

These elevated concentrations in water and sediment indicated recent inputs of TBT in the area and suggest these areas as hotspots for OTs contamination in South America.

Another recent study conducted in Argentina analyzed TBT concentrations in sediment samples and correlated with imposex incidence in 12 gastropod species from 40 localities along 4,700 Km of Argentinean coastline (Bigatti et al. 2009). The localities with higher levels of TBT contamination were Mar del Plata harbor (728 ng Sn g<sup>-1</sup>) and Puerto Deseado harbor (1,370 ng Sn g<sup>-1</sup>), whereas low values were found in San Antonio Oeste (33.3 ng Sn g<sup>-1</sup>), Punta Cuevas (1.9 ng Sn g<sup>-1</sup>), Caleta Cordova (5.1 ng Sn g<sup>-1</sup>) and Caleta Sara (5.6 ng Sn g<sup>-1</sup>) located at the coast of Patagonia.

Six studies have analyzed organotin in sediments from areas under the influence of important harbors from the southern (São Francisco do Sul, Itajaí-Navegantes and Imbituba (Oliveira et al. 2010); Paranaguá bay (Santos et al. 2009); southeastern (Coast of São Paulo (Godoi et al. 2003b)); Guanabara bay (Fernandez et al. 2005; Almeida et al. 2004); and northeastern (Todos os Santos bay (Felizzola et al. 2008)) Brazil.

Butyltin compounds were determined in 17 samples of surface sediments collected from areas under the influence of three harbors (São Francisco do Sul, Itajaí-Navegantes and Imbituba) in the coast of Santa Catarina state (southern Brazil). The BTs concentrations ranged from < 130 to 1,137 ng Sn g<sup>-1</sup> dw for TBT, < 160 to 394 ng Sn g<sup>-1</sup> dw for DBT and < 25 to 312 ng Sn g<sup>-1</sup> dw for MBT. The highest concentration of total BTs was found at Itajaí river dockyard, indicating intense inputs of organotin-based antifouling paints to the environment. However, it was observed the occurrence of heavy contaminated sites relatively close to places with low to moderate BT levels in the three studied estuaries, which may be related to local sources such as the shipyards and the small boats that were still using TBT-based antifouling paints. Substantial amounts of the degradation products (DBT and MBT) were also determined in those studied areas,

indicating that natural attenuation is contributing to the sediment remediation of these areas (Oliveira et al. 2010).

Additionally, TBT levels up to 2,800 ng Sn g<sup>-1</sup> were found in sediments of Paranaguá bay, whereas MBT levels were even higher (up to 4,000 ng Sn g<sup>-1</sup>) in most of the 20 studied sites along the bay (Santos et al. 2009). OTs levels up to 700 ng L<sup>-1</sup> in suspended particulate matter (considering the water concentration of particulate matter) were also found in this study. These results indicated that Paranaguá bay is the most contaminated area by organotin compounds among the studied areas throughout the Brazilian coastline. According to the authors, the high concentrations detected were related to the presence of two important harbors inside the bay (Paranaguá and Antonina harbors) and also to the pattern of local circulation and tidal action. In addition, 17 out of 20 sediment samples were collected inside the navigation channel, and all samples were taken in July 2006 (before the TBT banishment). There were no regulation on TBT use and the control on antifouling paints use was virtually absent in Brazil at that time. The predominance of metabolites over the parental compound might be related to the favorable biotic and abiotic environmental conditions to degrade TBT in the sediments.

Organotin concentrations (TBT, DBT and MBT) were analyzed in sediments of five different areas along the coast of São Paulo state: Ubatuba, São Sebastião, Guarujá, Santos, and Cananéia (Godoi et al. 2003b). Concentrations ranged from 17 to 847 ng Sn g<sup>-1</sup>, for TBT, 14 to 421 ng Sn g<sup>-1</sup> for DBT and 36 to 367 ng Sn g<sup>-1</sup> for MBT, whereas the highest TBT levels were found in areas nearby marinas and harbors (i.e. Santos and Guarujá).

Guanabara bay (Rio de Janeiro state) constitutes the most dramatic example of human-made degradation along the Brazilian coast (Almeida et al. 2004). The estuary houses the second most important commercial harbor in Brazil with 1700 ships/year

(CDRJ 2000). In addition to harbor activities, there are several shipyards, two naval bases and many marinas within the bay (Kjerfve et al. 1997). Two independent studies analyzed organotins in sediments of Guanabara bay (Fernandez et al. 2005; Almeida et al. 2004). Almeida et al. (2004) studied butyltin speciation in five sediment cores sampled from different sites inside Guanabara bay. Total tin concentrations were also analyzed to verify the final point of dealkylation. The TBT concentration in surface sediments ranged from 14 (environmental protection area) to 742 ng Sn g<sup>-1</sup> (vicinity of a major shipyard). According to the authors, the space-time distribution of organotin species in the sediments of Guanabara bay was very irregular and there is little evidence that extensive degradation has occurred after sedimentation. Fernandez et al. (2005) examined organotin concentrations in nine sites inside Guanabara bay (Guapimirin, Paquetá island, D'água island, Niterói mooring site, Ishikawajima shipyard, Niterói ferryboat, Rio de Janeiro harbor, Glória marina, and Botafogo inlet). The concentrations ranged from 10 to 520 ng Sn g<sup>-1</sup> for TBT, < 4.5 to 394 ng Sn g<sup>-1</sup> for DBT, < 3.9 to 39.4 ng Sn g<sup>-1</sup> for TPhT (triphenyltin) and < 4.5 to 18.7 ng Sn g<sup>-1</sup> for MPhT (monophenyltin), while MBT and DPhT (diphenyltin) were not detected in this study. This was the first study to analyze phenyltins in the Brazilian aquatic environments. These results revealed that Guanabara bay can also be considered as a “hot-spots” for TBT contamination in the South American coast.

With an area of the approximately 1,000 km<sup>2</sup>, the Todos os Santos bay is the largest bay in the Brazilian coast. Located in the northeastern region, Todos os Santos bay has witnessed since the 50's an increasing industrialization and a subsequent increase of shipping activities in the area. Felizzola et al. (2008) have analyzed OTs in 17 surface sediments of Todos os Santos bay and have observed TBT contamination in all of the sites. The organotin concentrations observed in that study ranged from < 5.4 to 15.9 ng Sn g<sup>-1</sup> of

TBT, while DBT and MBT were detected only in 1 out of 17 sampled sites (Bimarras Sul, DBT = 28.8 and MBT = 4.0 ng Sn g<sup>-1</sup>). These results were the lowest found so far for sediments from the Brazilian coast (Figure 2), which could be related to the shallow (average of 6 m), highly transparent (relatively low concentration of suspended matter, 2.15–10.07 mg L<sup>-1</sup>) and turbulent (caused by winds and tidal currents) water of Todos os Santos bay. Thus, Todos os Santos bay can be considered as a low to moderately impacted area for organotin contamination. According to the authors, the virtual absence of DBT and MBT in sediments of Todos os Santos bay is probably due to the fact that the TBT found in paint particles is not easily degraded. However, considering the intense hydrodynamic conditions in Todos os Santos bay, it is more likely that organotin compounds are rapidly degraded, which resulted in DBT and MBT concentrations below the detection limits of the analytical method used.

Although South America is constituted by developing countries and, therefore, is supposedly less industrialized, levels of organotins observed in most of the studied areas sediments were at a similar magnitude of those observed in the developed and highly industrialized countries, such as the USA (Landmeyer et al. 2004), Australia (Haynes and Loong 2002), Japan (Harino et al. 2007), Italy (Chiavarini et al. 2003b), and Spain (Díez and Bayona 2009) (Figure 2). These findings are probably due to the absence of pre-banishment regulatory strategies (except Argentina) and a lack of inspections on the antifouling usage in South American countries. All studies emphasized that highest OTs concentrations were found nearby potential sources, such as shipyards, harbors and marinas, which was also demonstrated by other worldwide studies (Rato et al. 2008).

Based on the steps of BTs degradation (TBT→DBT→MBT and inorganic tin) (Clark et al. 1988), the predominance or high levels of TBT indicated recent inputs to the environment. However, when DBT and/or MBT predominated in sediments, the

contamination might be considered historic or, alternatively, a fast degradation process might have taken place (Oliveira et al. 2010). The Figure 3 shows the organotin relative composition reported for sediments from several South American coastal areas. The degradation products (DBT and MBT) predominated over TBT concentrations in the sediments of Paranaguá bay, São Francisco do Sul harbor, Imbituba harbor and San Vicente bay, which might be already an indication a of a certain effectiveness of the TBT banning by IMO, since most of these data was collected after its implementation. However, these comparisons must be carefully analyzed since field data could be influenced by the local characteristics of several environmental factors. Additionally, in locations where high BTs concentrations were detected (i.e. Paranaguá bay) the DBT and MBT levels could be related to both old and fresh inputs of TBT.

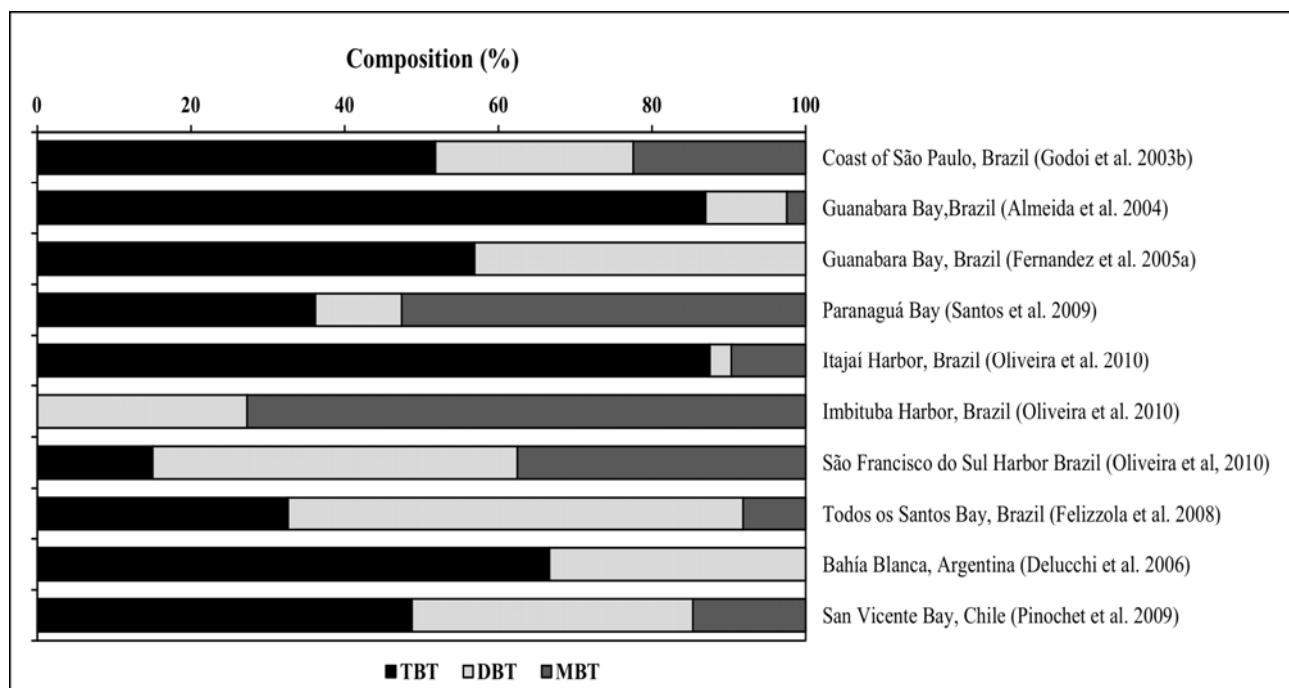


Figure 3: Relative composition of butyltin compounds reported for sediments of South American coastal areas.

## OTs in Marine Mammals

Marine mammals (mainly cetaceans) have been used worldwide as biomonitors of aquatic contamination (Tanabe and Subramanian 2006). Due to their apparently lower capacity to metabolize organotin compounds, when compared with other mammals (Tanabe 1999), cetaceans have shown significant accumulation and body distribution of OTs (Tanabe and Subramanian 2006). In South America, only one study has determined OTs in cetaceans (unpublished data). TBT, DBT, MBT and TPhT were detected in all liver samples analyzed from five different dolphin species accidentally caught or found stranded along the coast of Paraná and south coast of São Paulo (southern Brazil) during 1997 and 1999. The OTs levels ( $\Sigma$ TBT, DBT, MBT and TPhT) ranged from 180 to 7300 (average of 2758) ng Sn g<sup>-1</sup> (wet weight) for estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*; n= 15), from 520 to 4300 (average of 2535) ng Sn g<sup>-1</sup> (wet wt) for franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*; n=21), from 240 to 460 (average of 391) ng Sn g<sup>-1</sup> (wet wt) for Atlantic spotted dolphin (*Stenella frontalis*; n=2), 440 ng Sn g<sup>-1</sup> (wet wt) for common dolphin (*Delphinus capensis*; n=1) and 57 ng Sn g<sup>-1</sup> (wet wt) for striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*; n=1). The hepatic organotin concentrations ( $\Sigma$ OTs) found in estuarine and franciscana dolphins from southern Brazilian were in the same order of magnitude as levels found for cetaceans from very industrialized areas around the world (i.e. Japan, Hong Kong, Italy, and USA) (Iwata et al. 1995; Kim et al. 1996; Tanabe et al. 1998; Takahashi et al. 2000; Kannan et al. 1996; Kannan et al. 1997; Madhusree et al. 1997), and much higher than those observed for other developing countries such as Turkey, China, Philippines, and India (Madhusree et al. 1997; Tanabe et al. 1998) (Figure 4).



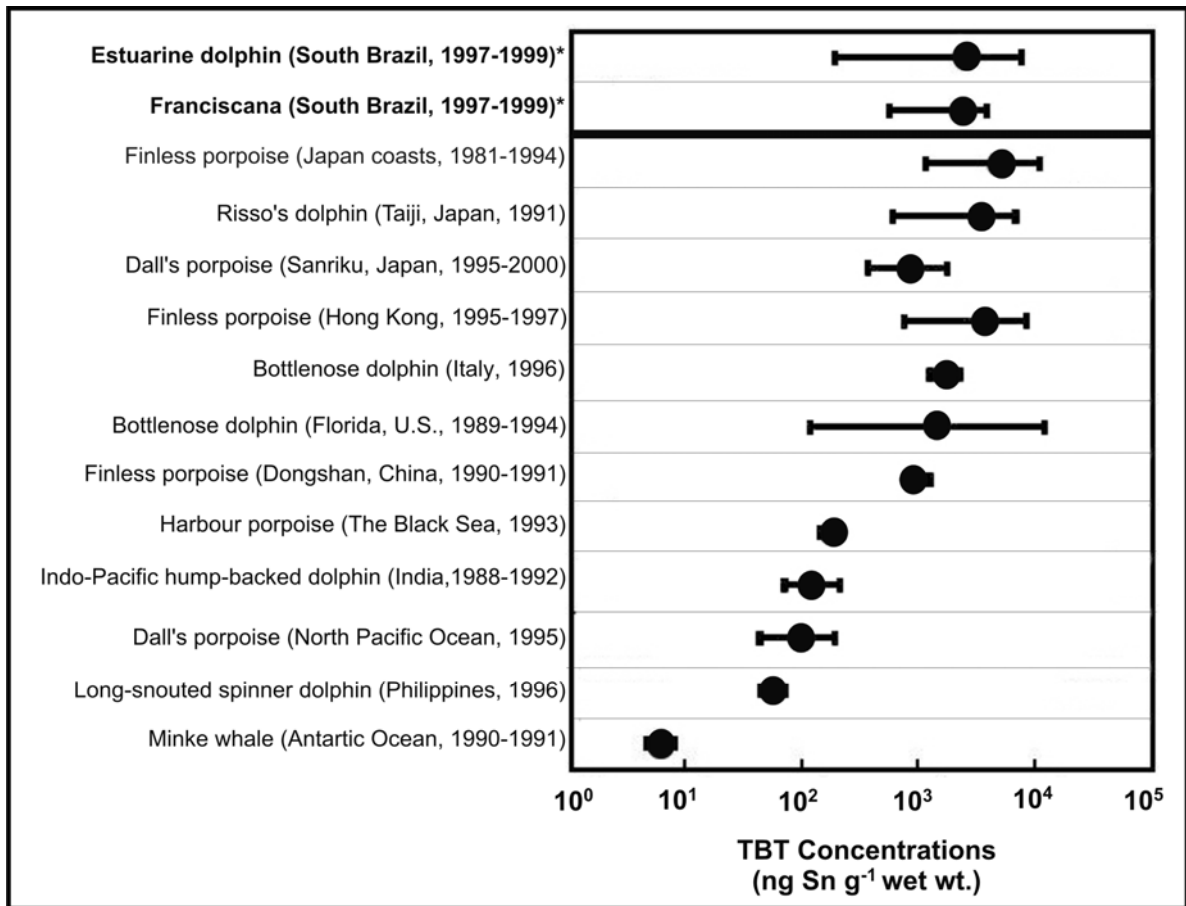


Figure 4: Butyltin concentration (ng g<sup>-1</sup> wet wt) in liver of different dolphins reported for South American coastal areas (\*) and several other regions of the world.

Another study has determined total tin in liver samples of 13 cetacean species from Guanabara bay and coast of Espírito Santo (southeastern Brazil) (Dorneles et al. 2008). The authors assumed that hepatic tin in cetaceans is predominantly in the organic forms, thus levels of total tin in the livers reflected the anthropogenic inputs of organotin (Tanabe 1999). Based on that, the contamination levels of the studied species can be considered higher than or similar to those levels observed in cetaceans from developed countries. Concentrations of Sn as high as 4803 ng g<sup>-1</sup> were detected in specimens of *Sotalia guianensis*.

The results for mammals together with those for sediments indicated that sources of OTs in the Southern Hemisphere (particularly in the southern Brazilian coast) can be

comparable to those already experienced by developed countries from the Northern Hemisphere. That could be due to the quick industrial and harbor activities in specific areas of some South American countries in the last 2-3 decades.

### **Imposex in the South American coast**

Imposex is defined as a superimposition of male sexual characters, such as penis and *vas deferens*, onto females of gastropods exposed to OTs (Gibbs and Bryan 1987). This phenomenon results from, a still unknown, metabolic perturbation in endocrinology regulation of prosobranch gastropods (Porte et al. 2006; Sternberg et al. 2010) that was firstly reported by Blaber (1970) in the caenogastropod *Nucella lapillus*. Nowadays, the imposex is a widespread problem which was already registered in approximately 170 prosobranch species (Shi et al. 2005). The imposex occurrence and intensity are proportional to the environmental levels of OTs compounds, with a clear cause effect relationship (Matthiessen and Gibbs 1998). Hence, this powerful biomarker has been used worldwide to map tributyltin (TBT) pollution along the marine environments (Sousa et al. 2009). Imposex levels are usually measured through biometric indexes such as: Relative Penis Size Index (RPSI), Relative Penis Length Index (RPLI), and Vas Deferens Sequence Index (VDSI), in addition to percentage of affected females (Gibbs et al. 1987).

The RPSI index, which has been more used for animals with advanced imposex stages, is obtained by the equation  $RPSI = (\text{mean penis length in females})^3 / (\text{mean penis length in males})^3 \times 100$ , whereas  $RPLI = (\text{mean penis length in females} / \text{mean penis length in males}) \times 100$  has been more used during the initial imposex levels. These numerical indexes indicate the levels of imposex development in the studied sample (Bryan et al. 1987).

The VDSI index was, initially proposed by Gibbs *et al.* (1987) to be used in *Nucella lapillus*, and later modified by several authors for the application with others

prosobranch species (Fernandez et al. 2005; Horiguchi 1998; Queiroz et al. 2007; Stroben et al. 1995). In general, the VDSI index is an individual verification of 6 different imposex stages considering the following parameters: the penis and vas deferens formation, the penis size, the penis and vas deferens ligation, the blocking of the vulva, and the presence of abortive capsules.

Due to its simplicity and low costs, imposex in gastropods has been used for assessing and monitoring the contamination by OTs in several areas along the South American coast. To our knowledge, 28 gastropod species were reported so far as imposex exhibitors in South America (Table 1).

The occurrence of imposex in *Stramonita haemastoma* and *Stramonita rustica* have been monitored to assess the impact of OTs along large extension of the Brazilian coast (Castro et al. 2007b; Castro et al. 2007a; Fernandez et al. 2005). Those studies included almost all of the largest harbors distributed along the 7300 km of the Brazilian coast (Figure 1).

In the northeastern Brazilian coast, the imposex levels were verified in 82 sites distributed over 10 areas of intense shipping activities, such as: Pecém harbor (7 sites) and Mucuripe harbor (12 sites) in Ceará state; Natal harbor (9 sites) in Rio Grande do Norte state; Cabedelo harbor (9 sites) in Paraíba state; Recife harbor (7 sites) and Suápe harbor (7 sites) in Pernambuco state; Jaraguá harbor (10 sites) in Alagoas state; Sergipe river estuary (7 sites) in Sergipe state; and Todos os Santos bay (Salvador and Aratu harbors; 14 sites) in Bahia state (Castro et al. 2007b). Although the study showed imposex occurrence in all monitored areas, its levels were related to the intensity of marine traffic in each area. For example, Suape harbor, which had recently started its operations at that time, showed imposex at just one of the seven monitored sites. On the other hand, busier harbors, such as a Salvador and Mucuripe, showed imposex in most of the sampled sites. The authors also

emphasized that other factors may affect the imposex levels, such as local hydrodynamic and the harbor location (*in shore* or *off shore*).

Table 1: Prosobranch species from South American coastal areas which imposex was already reported.

<b>Species</b>	<b>Location</b>	<b>References</b>
<i>Acanthina monodon</i>	San Antonio harbor, Chile	(Huaquin et al. 2004)
<i>Adelomelon ancilla</i>	Peninsula Valdés, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
	Bahía San Gregorio, Argentina	
<i>Adelomelon beckii</i>	Mar del Plata harbor, Argentina	(Arrighetti and Penchaszadeh 2010)
<i>Adelomelon brasiliiana</i>	Mar del Plata harbor, Argentina	(Penchaszadeh et al. 2001; Bigatti et al. 2009; Bigatti et al. 2009)
<i>Adelomelon ferrusacci</i>	Punta Quilla, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
<i>Buccinanops cochlidium</i>	Punta Quilla, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
<i>Buccinanops globulosus</i>	San Antonio Oeste, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
	Golfo Nuevo, Argentina	
<i>Buccinanops monilifer</i>	Mar del Plata harbor, Argentina	(Penchaszadeh et al. 2001; Averbuj and Penchaszadeh 2010)
<i>Chichoreus brevifrons</i>	Margarita island, Venezuela	(Miloslavich et al. 2007)
<i>Chichoreus margaritensis</i>	Margarita island, Venezuela	(Miloslavich et al. 2007)
<i>Chorus giganteus</i>	Renocavi bay, Chile	(Gooding et al. 1999)
	San Vicente bay, Chile	(Bigatti et al. 2009)
<i>Cymatium parthenopeum</i>	Cabo Frio, Brazil	(Castro et al. 2007c)
	Vitória harbor, Brazil	(Costa et al. 2009)
<i>Leucozonia nassa</i>	Cabo Frio, Brazil	(Castro et al. 2007c)
	Margarita island, Venezuela	(Miloslavich et al. 2007)
<i>Melongena melongena</i>	Cispata iay, Colombia	(Hernandez and Stotz 2004)
<i>Nassarius vibex</i>	Fortaleza, Brazil	(Lima-Verde et al. 2010)
	Rio de Janeiro, Brazil	(Cardoso et al. 2009)
<i>Nucella crassilabrum</i>	Renocavi bay, Chile	(Gooding et al. 1999)
	San Vicente bay, Chile	
<i>Olivancillaria deshaysiana</i>	Mar del Plata harbor, Argentina	(Teso and Penchaszadeh 2009)
<i>Odontocymbiola megallanica</i>	Peninsula Valdés, Argentina	(Bigatti and Penchaszadeh 2005)
<i>Pareuthria plumbea</i>	Caleta Sara, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
	Cro. Rivadavia, Argentina	
	Puerto Camarones, Argentina	
	Puerto Deseado, Argentina	
	Puerto San Julián, Argentina	
	Rada Tilly	
	Ushuaia, Argentina	
<i>Prunum martini</i>	San Antonio Este, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
<i>Pugilina morio</i>	Fortaleza, Brazil	Unpublished data
<i>Stramonita haemastoma</i>	Northeastern Brazilian coast	(Castro et al. 2007b)
	Guanabara bay, Brazil	(Fernandez et al. 2005)
	Southern Brazilian coast	(Castro et al. 2007a)
<i>Stramonita rustica</i>	Northeastern Brazilian coast	(Castro et al. 2007b)
<i>Thais deltoidea</i>	Vitória harbor, Brazil	(Costa et al. 2008)
<i>Trophon geversianus</i>	Peninsula Valdés, Argentina	(Bigatti et al. 2009)
	Puerto San Julián, Argentina	
	Punta Quilla, Argentina	
	Ushuaia, Argentina	
<i>Voluta ebraea</i>	Fortaleza, Brazil	(Castro et al. 2008)
<i>Xanthochorus cassidiformis</i>	Renocavi bay, Chile	(Gooding et al. 1999)
	San Vicente bay, Chile	
<i>Ximenopsis muriciformis</i>	Ushuaia, Argentina	(Bigatti et al. 2009)

## Imposex in the Brazilian coast

In Guanabara bay (Rio de Janeiro), imposex in *S. haemastoma* was strongly related to the potential organotin sources (harbors, marinas, and shipyards), where 10 out of 14 sites showed imposex (Fernandez et al. 2002). These results correlated well with organotin levels found in surface sediments of Guanabara bay (see Item 2 above) (Fernandez et al. 2005). Similarly, a good relationship was found between imposex indexes in the muricid *S. haemastoma* and the intensity of ship traffic in areas under the influence of four main harbors from southern Brazil (Paranaguá harbor in Paraná state, São Francisco do Sul and Itajaí harbors in Santa Catarina state, and Rio Grande harbor in Rio Grande do Sul state) (Castro et al. 2007a). The highest imposex indexes were observed in Babitonga bay (Santa Catarina state), which is under the influence of São Francisco do Sul harbor. Although this area did not hold the busiest among the studied harbors, it is a semi-closed bay that probably hinders the contaminant dispersion.

Environmental gradients of imposex indexes (decreasing levels with the increasing distance from possible sources) were found in most of studied areas along the Brazilian coast (Castro et al. 2007b). Similar results were observed in many other locations, such as the Mediterranean sea using *Hexaplex trunculus* (Axiak et al. 1995), Crok harbor, Ireland, using *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin et al. 1996), Phuket island, Thailand, using *Chicoreus capucinus* and *Thais distinguenda* (Bech et al. 2002) and Kyllibegs, Ireland, using *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin and Minchin 1997).

Imposex was also detected in punctual studies along the Brazilian coast. Gastropods populations of *S. haemastoma*, *Cymathium partenopeum* and *Leucozonia nassa* from Cabo Frio (Rio de Janeiro state) (Castro et al. 2007c); *Nassarius vibex* from Itacuruça island (Rio de Janeiro)(Cardoso et al. 2009), the endemic marine snail *Voluta ebraea* (Castro et al. 2008) and *Nassarius vibex* (Lima-Verde et al. 2010) from Ceará state; and *C.*

*partenopeum*, *T. deltoidea* and *L. nassa* from Espirito Santo state (Costa et al. 2009) were reported as impacted.

#### Imposex in the Argentinean coast

On the Argentinean coast, a large biomonitoring study was recently conducted (Bigatti et al. 2009). This was the first detailed monitoring study in South America which simultaneously analyzed imposex in snails and TBT levels in surface sediments. The results demonstrated that most affected areas were those with high marine traffic, such as commercial, fishery and touristic ports. The localities with higher imposex incidence were Mar del Plata harbor, San Antonio Oeste, San Antonio Este harbor, Puerto Madryn harbor, Puerto Deseado harbor, Puerto Julián harbor and Ushuaia harbor. Among the analyzed species, those inhabiting soft and mixed bottoms, such as *Buccinanops globulosus*, *Buccinanops cochlidium*, *Pareuthria plumbea*, *Ximenopsis muriciformis*, *Prunum martini*, *Adelomelon brasiliiana*, *Adelomelon ferrusacci*, *Adelomelon ancilla*, and *Odontocymbiola magellanica*, showed better imposex response for areas with low or medium TBT contamination. On contrary, no imposex was detected in the species inhabiting intertidal hard bottoms (*Trophon geversianus* and *Crepidula aculeata*) with low to medium contamination levels. In conclusion, the results of imposex in gastropods and the sediment analyses demonstrated that all the studied areas of the Argentinean coast were contaminated by TBT.

In another study, imposex was detected in *Odontocymbiola magellanica* collected from 12 sites inside the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina). This investigation also observed that the more intense the marine traffic zones the higher the imposex levels (Bigatti and Penchaszadeh 2005). Other punctual studies in Mar del Plata pointed out imposex in other gastropod species, such as *Adelomelon brasiliiana* (Penchaszadeh et al.

2001), *Buccinanops monilifer* (Averbuj and Penchaszadeh 2010), *Adelomelon beckii* (Arrighetti and Penchaszadeh 2010) and, *Odontocymbiola deshayesiana* (Teso and Penchaszadeh 2009).

#### Imposex in other South American coastal areas

Others gastropod species reported as imposex exhibitors in South America coastal areas were: *Chorus giganteus*, *Xantochorus cassidiformis* and *Nucella crassilabrum* collected from San Vicente bay (central Chile) (Gooding et al. 1999), *Acanthina monodon* from San Antonio harbor and Renocavi bay (central Chile) (Huaquin et al. 2004); *Chicoreus brevifrons*, *C. margaritensis* and *L. nassa* from Margarita island and continental coast of Venezuela (Miloslavich et al. 2007); and *Melongela melongela* from Cispatá bay (Colombia) (Hernandez and Stotz 2004). In most of these the imposex was accidentally found during studies about the reproductive system of mollusk species.

#### **Legislation**

The French Government was the first to prohibit the use of organotin-based antifouling paints after the oyster industry collapse in Arcachon bay in the early 80's (Alzieu et al. 1986; Alzieu 2000). Since small boats were blamed to cause the problem in coastal waters, the use of these paints on vessels (< 25 meters in length) was banned in January 1982 by the Ministry of Environment of France (Evans et al. 2000). Additionally, in October 1992, antifouling paints containing TBT were forbidden for the general public and were only available in special packaging for shipyards (Alzieu 1998). Similar legislation were introduced between the late 80's and early 90's in, the United Kingdom, United States of America, Australia, Canada, Netherlands, Japan, Denmark, and Hong Kong (Champ 2000). Austria and Switzerland, which have no direct access to the ocean, banned TBT in

their lakes and rivers to minimize the direct effects on freshwater communities and indirect impacts on marine habitats downstream (Becker Van-Slooten and Tarradellas 1994; Fent 1996). Table 2 summarizes the nations (including South American countries) that have prohibited the use of TBT over the last few years.

Since shipping is a worldwide activity, controls on antifouling systems by individual nations is not effective enough to prevent pollution, even in their own territorial waters. Therefore, the problem was brought to the International Maritime Organization (IMO). IMO is a specialized agency of the United Nations with 167 member states and three associate members, which aim to develop and maintain a comprehensive regulatory framework for shipping, including safety and environmental concerns. Environmental issues are normally deliberated by the Marine Environmental Protection Committee (MEPC) that, for several years, collected information on the effects of organotin compounds on the marine environment and human health. Therefore, the MEPC approved a draft resolution of the Assembly banning new applications of organotin-based antifouling paints from 1<sup>st</sup> January 2003 and their presence on ship hulls (total ban) from 1<sup>st</sup> January 2008 (IMO 2008).



Table2: Overview of restraints concerning the use of TBT (Modified from IMO, 2000).

Country	Year	Regulations
Argentina	1998	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels.
Australia	1989	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 meters (m) in length. Maximum leaching rate of 5 µg/cm <sup>2</sup> /day for vessels greater than 25 m in length. All dry-docks must be registered in the Environmental Protection Agency due to discharges. All antifoulants must be registered.
Austria	1989	Banned the use of TBT antifouling paints in fresh-water lakes.
Brazil	2007	Prohibited the use of TBT-based paints on large vessels.
Canada	1989	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels less than 25 m in length, except for aluminium-hulled vessels. Maximum leaching rate of 4 µg/cm <sup>2</sup> /day for vessels greater than 25 m in length. All antifoulants must be registered.
Chile	2001	Only regulates values regarding metallic tin (Sn <sup>0</sup> ), where the limits allowed in areas of coast protection is 0.5 mg L <sup>-1</sup> . Legislation by National Institute of Normalization.
Commission of the European Community (EC)* non-EC members	1991 Varies	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m in length. TBT antifoulants available only in 20L containers. Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m in length (most countries).
Finland	1991	Prohibited the use of TBT-based paints on boats smaller than 25 m in length.
France	1982	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m in length, except for aluminium-hulled vessels.
Germany	1990	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m. Ban on retail sale. Ban on their use on structures for mariculture. Regulation for the safe disposal of antifouling paints after removal.
Hong Kong	1990	All TBT antifoulants must have a valid permit for import/supply. All antifoulants must be registered.
Japan	1990 1992	TBT banned for all new vessels. TBT banned for all vessels.
New Zealand	1989	The application of TBT copolymer antifouling paint was banned with three exceptions: aluminum-hulled vessels, the aluminum outdrive, or any vessel greater than 25 m in length. The application of TBTO free-association paints is banned. Maximum leaching rate of 5 µg/cm <sup>2</sup> /day for vessels greater than 25 m in length. All antifoulants must be registered.
Norway	1989	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m in length.
South Africa	1991	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m in length. TBT antifoulants available only in 20-L containers. All antifoulants must be registered.
Sweden	1989 1992	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels smaller than 25 m in length. Maximum leaching rate of 4µg/cm <sup>2</sup> /day for vessels greater than 25 m in length. All antifoulants must be registered.
Switzerland	1987	The use of TBT-based antifouling paints is banned in fresh water lakes. All antifoulants must be registered
The Netherlands	1990	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels less than 25 m in length. Washing/blasting slurry used to prepare TBT antifoulants may be treated as hazardous waste. TBT antifoulants available only in 20 L containers. All antifoulants must be registered.
United Kingdom	1985 1987	Sale of TBT-based paints restricted, effective bar on TBTO free-association paints. Prohibited the use of TBT-based paints on vessels less than 25 m in length and on fish-farming equipment. TBT antifoulants available only in 20 L containers. All antifoulants to be registered as pesticides; Advisory Pesticides Committee must approve sale and use. Washing/blasting slurry treated as hazardous.
United States	1988 1990	Prohibited the use of TBT-based paints on vessels less than 25 m in length, except for aluminium-hulled vessels. Maximum leaching rate of 4 µg/cm <sup>2</sup> /day for vessels greater than 25 m in length. All antifoulants must be registered. TBT-based antifouling paints can only be applied by certified applicators.
Worldwide (IMO)	ban 2003-2008	Proposed ban for 1st Jan 2003 – no reapplication of TBT. January 1 <sup>st</sup> , 2008. No ships or structures shall bear TBT. To be ratified if 25% of shipping tonnage or 25 of the worlds shipping nations sign.

In Brazil, the resolution 357 of the National Environment Council (CONAMA 2005) established the maximum concentrations of TBT in water. Allowed levels vary according to the water category (fresh, brackish or sea water) and determined use. Levels up to 10 and 370 ng L<sup>-1</sup> are tolerated for class 1 and 2, respectively, of brackish and sea waters. There are no regulations on TBT sedimentary levels though. The use of organotin-based antifouling paints was definitively banned in November 2007 by means of NORMAM-23/DPC. This regulation also determined inspection and registration standard procedures for all antifouling systems, as well as for management of residues of these compounds (Marinha do Brasil 2007). In Argentina, the institution that regulates maritime transportation (Prefectura Naval Argentina) prohibited the use of TBT-based antifouling paints in all types of vessels back in 1998 (Resolution 04/98). Although, this resolution also regulated procedures for coatings replacement (DPMA 1998), organotin-based paints are still commercialized in the country (Bigatti et al. 2009). In Chile, the National Institute of Normalization regulates only values for metallic tin (Sn<sup>0</sup>) in water (INN 2001); the limit allowed in areas of coastal protection is 0.5 mg L<sup>-1</sup>. To our knowledge, there is no legislation on the use of antifouling paints in the other South American countries.

### **Future trends**

Due to the environmentally harmful effects of TBT-based self-polishing paints and their consequent worldwide banning (IMO, 2008), manufacturers had been forced to urgently study and develop new antifouling paints that were more environmentally friendly (Almeida et al. 2007). As a result, 16 products were homologated by the IMO International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships to be used as antifouling biocides (Thomas et al. 2001). These booster biocides are: Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine, Chlorothalonil, Dichlofluanid, Thiram, Busan (TCMTB), TCMS Pyridine, Pyridine-triphenylboron, Zinc Pyrithione, Cuprous Pyrithione, Ziram, Maneb, Cuprous

Oxide, Cuprous Thiocyanate and Copper Naphthenate. Currently, the utilization of coatings containing copper combined with one or more of these booster biocides have been an usual alternative to organotin (Konstantinou and Albanis 2004). However, toxicity and deleterious environmental effects have already been detected for some of these biocides (Zhang et al. 2008; Manzo et al. 2008).

In order to develop antifouling systems of high performance, the naval industry have tried to develop more efficient, durable and less toxic products. According to IMO, the ideal antifouling biocide should have: broad spectrum activity, low mammalian toxicity, low seawater solubility, low bioaccumulation in the food chain, very low persistency (ideally not persistent) in the environment, compatibility with paint raw materials and good price (Takahashi 2009). Therefore, new and more environmentally friendly approaches have been investigated. For example, natural products produced by sessile fouling-free marine organisms (i.e. terpenes, phenols, steroids and others) have showed similar antifouling properties to TBT, generating expectations that these compounds could be used as antifouling agents in near future (Omae 2006). Additionally, biocide-free antifouling systems are entering the market. These antifouling systems are based on silicones, fiber coats, epoxides, polyurethane and polyvinyl that reducing the adhesion capacity of aquatic organisms onto ship hulls (Watermann et al. 2005). However, ecotoxicological studies showed that biocide-free antifouling systems can also be toxic (Karlsson and Eklund 2004).

Another important issue is the replacement of TBT-based antifouling systems for new paints after the implementation of IMO resolution (IMO 2008). The paint particles removed during the replacement process could have possible caused a large recent worldwide input of organotin compounds into coastal environments (Kotrikla 2009). This could be confirmed by new studies in areas under the influence of shipyards. In addition, it

is reasonable to assume that previously organotin contaminated sites will be the same ones thereafter affected by the new antifouling biocides. Furthermore, monitoring of the OTs contamination (using imposex in gastropods and/or chemical determinations) has shown to be an extremely efficient tool for mapping affected areas by past, present or future use of antifouling biocides (Konstantinou and Albanis 2004).

The restrictions imposed by developed countries and IMO on TBT usage have had some positive effects. Recovery has been reported in marine gastropods populations severely affected by TBT (Lahbib et al. 2009) and reductions in environmental concentrations of TBT have been reported in Europe and Asia (Choi et al. 2010; Galante-Oliveira et al. 2009). Although studies evaluating the effectiveness of TBT global banning are still not available for South American countries, the existing data and the ongoing surveys in the Atlantic coast are targeting the understanding of temporal trends on TBT contamination levels and imposex.

## **Conclusions**

Imposex occurrence was observed in gastropod populations of several sites from South American coastal areas and high concentrations of OTs in sediments from areas under the influence of ship activities from the Atlantic coastal areas, particularly in Paranaguá bay (Brazil), Guanabara bay (Brazil), Mar del Plata harbor (Argentina), Bahía Blanca (Argentina), and Puerto Deseado (Argentina). High OTs levels in liver of dolphins from the southern Brazilian coast were also observed. Despite no available data for coastal areas of Surinam, Guyana, French Guyana, and Uruguay (Atlantic coast), and very limited data for the Pacific coast, even considering ongoing studies on the Peruvian and Equatorial coastal areas, the widespread TBT contamination along South American coastal areas is evident. Although the clear relationship between organotin contamination and imposex in gastropods, it is difficult to compare on a global scale results obtained with different South

American species, since each one presents biological particularities which affect the intensity of imposex (Bech 1999). The lack of a unique species to cover larger areas is a limitation. Even though, the available data pointed out some “hot spots” in coastal areas under the influence of South American main harbors, and that OTs contamination showed a similar distribution pattern seen for countries of Northern Hemisphere. Therefore, the establishment of baselines of organotin contamination in the Pacific coast and the implementation of temporal trend studies in the South American coastal areas is crucial to verify the effectiveness of local regulations and OTs global ban, and to map the most sensitive areas related to present and future antifouling impacts.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Brazilian Research Council (CNPq) for the research grants of Ítalo Braga de Castro (141550/2007-4), Fernando Cesar Perina (134170/2007-5) and Gilberto Fillmann (PQ 311459/2006-4 and 314335/2009-9).

### **References**

- Almeida A. C., Wagener A. D. R., Maia C. B., Miekeley N. (2004). Speciation of organotin compounds in sediment cores from Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Applied Organometallic Chemistry*. 18, 694-704.
- Almeida E., Diamantino T. C., de Sousa O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*. 59, 2-20.
- Alzieu C. (2000). Environmental impact of TBT: the French experience. *Science of the Total Environment*. 258, 99-102.
- Alzieu C. L., Sanjuan J., Deltreil J. P., Borel M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*. 17, 494-498.
- Alzieu C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management*. 40, 23-36.
- Arrighetti F., Penchaszadeh P. E. (2010). Gametogenesis, seasonal reproduction and imposex of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. *Aquatic Biology*. 9, 63-75.
- Averbuj A., Penchaszadeh P. E. (2010). On the reproductive biology and impact of imposex in a population of *Buccinanops monilifer* from Mar del Plata, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 90, 729-734.

- Axiak V., Vella A. J., Agius D., Bonnici P., Cassar G., Cassone R., Chircop P., Micallef D., Mintoff B., Sammut M. (2000). Evaluation of environmental levels and biological impact of TBT in Malta (central Mediterranean). *Science of the Total Environment*. 258, 89-97.
- Axiak V., Vella A. J., Micallef D., Chircop P., Mintoff B. (1995). Imposex in Hexaplex Trunculus (Gastropoda, Muricidae) - First Results from Biomonitoring of Tributyltin Contamination in the Mediterranean. *Marine Biology*. 121, 685-691.
- Barroso C. M., Moreira M. H., Gibbs P. E. (2000). Comparison of imposer and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Marine Ecology Progress Series*. 201, 221-232.
- Beaumont A. R., Budd M. D. (1984). High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Marine Pollution Bulletin*. 15, 402-405.
- Bech M. (1999). Sensitivity of different Gastropod to Tributyltin contamination. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*. 19, 1-6.
- Bech M., Strand J., Jacobsen J. A. (2002). Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. *Environmental Pollution*. 119, 253-260.
- Becker Van-Slooten K., Tarradellas J. (1994). Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13, 755-762.
- Bigatti G., Penchaszadeh P. E. (2005). Imposex in *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) in Patagonia. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*. 88, 371-375.
- Bigatti G., Primost M. A., Cledón M., Averbuj A., Theobald N., Gerwinski W., Arntz W., Morriconi E., Penchaszadeh P. E. (2009). Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Marine Pollution Bulletin*. 58, 695-701.
- Blaber S. J. M. (1970). The occurrence of a penis-like out grow behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proceedings of the Malacological Societ of London*. 39, 231-233.
- Bryan G. M., Gibbs P. E., Pascoe P. L., Burt G. R. (1987). The use of the dog-whelk *Nucella lapillus*, as na indicator of tributyltin(TBT) contaminacion. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 67, 507-523.
- Bryan G. W., Gibbs P. E., Hummerstone L. G., Burt G. R. (1986). The Decline of the Gastropod *Nucella lapillus* Around Southwest England - Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 66, 611-640.
- Cardoso R. S., Caetano C. H. S., Cabrini T. M. B. (2009). Biphallia in imposexed females of marine gastropods: new record for *Nassarius vibex* from Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 69, 223-224.
- Castro I. B., Bemvenuti C. E., Fillmann G. (2007a). Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology*. 2, 73-79.
- Castro I. B., de Meirelles C. A. O., Matthews-Cascon H., Rocha-Barreira C. D., Penchaszadeh P., Bigatti G. (2008). Imposex in Endemic Volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). *Brazilian Archives of Biology and Techinology*. 51, 1065-1069.

- Castro I. B., Lima A. F. A., Braga A. R. C., Rocha-Barreira C. A. (2007b). Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology*. 2, 81-91.
- Castro I. B., Ribeiro-Ferreira V., Lima A. F. A., Meirelles C. A. O., Rocha-Barreira C. A. (2007c). Imposex in three prosobranch species from Ilha do Japonês, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Thalassas*. 23, 37-42.
- CDRJ. Reports on Rio de Janeiro Harbor Movement. Rio de Janeiro Docks Company. 1-9. 2000. Rio de Janeiro.
- CESBRA. Chemical products marketed by CESBRA. <http://www.cesbra.com.br/site/quimicos.asp> . 2011.
- Champ M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*. 258, 21-71.
- Chiavarini S., Massanisso P., Nicolai P., Nobili C., Morabito R. (2003b). Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*. 50, 311-319.
- Chiavarini S., Massanisso P., Nicolai P., Nobili C., Morabito R. (2003a). Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*. 50, 311-319.
- Choi M., Moon H. B., Yu J., Eom J. Y., Choi H. G. (2010). Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels from Busan Harbor of Korea Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 394-402.
- Clark E. L., Sterrit R. M., Lester J. N. (1988). The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment a Look at the Data. *Env Sci Tech*. 22, 600-604.
- CONAMA. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 357, 58-63. 2005. Brazil, Diário Oficial da União.
- Costa M. B., Otegui M. B. T., Barbeiro D. C., Fernandez M. A. (2009). *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (Von Salis, 1793)(Mesogastropoda: Ranellidae): A New Bioindicator of Organotin Compounds Contamination? *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology*. 3, 65-69.
- Costa M. B., Fernandez M. A., Barbiero D. C., Melo F. T. V. d., Otegui M. B. P., Ferreira B. S. (2008). First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*. 56, 145-148.
- Davies I. M., Harding M. J. C., Bailey S. K., Shanks A. M., Lange R. (1997). Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Marine Ecology Progress Series*. 158, 191-204.
- Davies I. M., McKie J. C., Paul J. D. (1987). Accumulation of tin and tributyltin from anti-fouling paint by cultivated scallops *Pecten maximus* and pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Marine Pollution Bulletin*. 22, 458-464.
- Delucchi F., Tombesi N. B., Freije R. H., Marcovecchio J. E. (2006). Butyltin compounds in sediments of the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*. 132, 445-451.
- Diez S., Abalos M., Bayona J. M. (2002). Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Research*. 36, 905-918.
- Diez S., Bayona J. M. (2009). Butyltin occurrence and risk assessment in the sediments of the Iberian Peninsula. *Journal of Environmental Management*. 90, S25-S30.

- Diez S., Jover E., Albaiges J., Bayona J. M. (2006). Occurrence and degradation of butyltins and wastewater marker compounds in sediments from Barcelona harbor, Spain. *Environment International*. 32, 858-865.
- Dorneles P. R., Lailson-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. (2008). Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. *Environmental Pollution*. 156, 1268-1276.
- Dowson D. H., Bubb J. M., Lester J. N. (1996). A Study of the Partitioning and Sorptive Behavior of Butyltins in the Aquatic Environment. *Applied Organometallic Chemistry*. 7, 623-633.
- DPMA. Prefectura Naval Argentina. Ordenanza 4/98 Tomo 6, Régimen para la protección del medio ambiente. Anexo 1. 1998.
- Dyrynda E. A. (1992). Incidence of Abnormal Shell Thickening in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Poole Harbor (UK), Subsequent to the 1987 Tbt Restrictions. *Marine Pollution Bulletin*. 24, 156-163.
- Evans S. M., Barnes N., Birchenough A. C., Brancato M. S., Hardman E. (2001). Tributyltin contamination in two estuaries and adjacent ocean coasts: Puget sound, Washington, and Narragansett Bay, Rhode Island (USA). *Invertebrate Reproduction & Development*. 39, 221-229.
- Evans S. M., Birchenough A. C., Fletcher H. (2000). The Value and Validity of Community-based Research: TBT Contamination of the North Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 40, 220-225.
- Felizzola J. F., Wagener A. d. L. R., Almeida A. C., Lin W. O. (2008). Butyltin speciation in sediments from Todos os Santos Bay (Bahia, Brazil) by GC-PFPD. *Química Nova*. 31, 89-93.
- Fent K. (1996). Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. *Science of the Total Environment*. 185, 151-159.
- Fernandez M. A., Wagener A. d. L. R., Limaverde A. M., Scofield A. L., Pinheiro F. M., Rodrigues E. (2005). Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research*. 59, 435-452.
- Fernandez M. A. S., Limaverde A. C., Castro I. B., Wagener A.L.R., Almeida A. C. O. (2002). Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Reports in Public Health*. 18, 463-476.
- Gadd G. M. (2000). Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *Science of the Total Environment*. 258, 119-127.
- Galante-Oliveira S., Oliveira I., Jonkers N., Langston W. J., Pacheco M., Barroso C. M. (2009). Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: evaluation of legislation effectiveness. *Journal of Environmental Monitoring*. 11, 1405-1411.
- Gibbs P. E., Bryan G. M. (1987). TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 68, 1482-1487.
- Gibbs P. E., Bryan G. M., Pascoe P. L., Burt G. R. (1987). The use of dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 67, 507-523.
- Godoi A. F. L., Favoreto R., Santiago-Silva M. (2003a). Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos. *Química Nova*. 26, 708-716.



- Godoi A. F. L., Montone R. C., Santiago-Silva M. (2003b). Determination of butyltin compounds in surface sediments from the Sao Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography*. 985, 205-210.
- Goldberg R. N., Averbuj A., Cleidon M., Luzzatto D., Nudelman N. S. (2004). Search for triorganotins along the Mar del Plata (Argentina) marine coast: finding of tributyltin in egg capsules of a snail *Adelomelon brasiliiana* (Lamarck, 1822) population showing imposex effects. *Applied Organometallic Chemistry*. 18, 117-123.
- Gooding M., Gallardo C., LeBlanc G. (1999). Imposex in Three Marine Gastropod Species in Chile and Potential Impact on Muriciculture. *Marine Pollution Bulletin*. 38, 1227-1231.
- Hallers-Tjabbes C. C., Wegener J. W., Van Hattum B., Kemp J. F., Ten Hallers E., Reitsema T. J., Boon J. P. (2003). Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrographical conditions. *Marine Environmental Research*. 55, 203-233.
- Harino H., Yamamoto Y., Eguchi S., Kawai S., Kurokawa Y., Arai T., Ohji M., Okamura H., Miyazaki N. (2007). Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi Bay, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 52, 179-188.
- Haynes D., Loong D. (2002). Antifoulant (butyltin and copper) concentrations in sediments from the Great Barrier Reef World Heritage Area, Australia. *Environmental Pollution*. 120, 391-396.
- Hernandez S., Stotz W. B. (2004). Reproductive biology of the "Copey" snail *Melongena melongena* (Linnaeus, 1758) in Cispat Bay on the Caribbean coast of Colombia. *Journal of Shellfish Research*. 23, 849-854.
- Horiguchi T. (1998). Imposex in marine gastropods. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 64, 907-908.
- Huaquin L. G., Osorio C., Verdugo R., Collado G. (2004). Morphological changes in the reproductive system of females *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda : Muricidae) affected by imposex from the coast of central Chile. *Invertebrate Reproduction & Development*. 46, 111-117.
- IMO. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. Available in <http://www.imo.org/conventions>. Accessed September 17th, 2009. IMO . 2008. 17-9-2008.
- INN. Norma Chilena de cualidad de las aguas. 2001. Instituto Nacional de Normalización.
- Iwata H., Tanabe S., Mizuno T., Tatsukawa R. (1995). High Accumulation of Toxic Butyltins in Marine Mammals from Japanese Coastal Waters. *Environmental Science and Technology*. 29, 2959-2962.
- Kan-Atireklap S., Tanabe S., Sanguansin J., Tabucanon M. S., Hungspreugs M. (1997). Contamination by butyltin compounds and organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand coastal waters. *Environmental Pollution*. 97, 79-89.
- Kannan K., Corsolini S., Focardi S., Tanabe S., Tatsukawa R. (1996). Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 31, 19-23.
- Kannan K., Senthilkumar K., Loganathan B. G., Takahashi S., Odell D. K., Tanabe S. (1997). Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the US Atlantic and Gulf coasts. *Environmental Science and Technology*. 31, 296-301.

- Kannan K., Tanabe S., Iwata H., Tatsukawa R. (1995). Butyltins in Muscle and Liver of Fish Collected from Certain Asian and Oceanian Countries. *Environmental Pollution*. 90, 279-290.
- Karlsson J., Eklund B. (2004). New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin*. 49, 456-464.
- Kim G. B., Tanabe S., Iwakiri R., Tatsukawa R., Amano M., Miyazaki N., Tanaka H. (1996). Accumulation of butyltin compounds in Risso's dolphin (*Grampus griseus*) from the Pacific coast of Japan: Comparison with organochlorine residue pattern. *Environmental Science and Technology*. 30, 2620-2625.
- Kjerfve B., Ribeiro C. H. A., Dias G. T. M., Filippo A. M., Da Silva Quaresma V. (1997). Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*. 17, 1609-1643.
- Konstantinou I. K., Albanis T. A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*. 30, 235-248.
- Kotrikla A. (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management*. 90, S77-S85.
- Lahbib Y., Abidli S., Chiffolleau J. F., Averty B., El Menif N. T. (2009). First record of butyltin body burden and imposex status in *Hexaplex trunculus* (L.) along the Tunisian coast. *Journal of Environmental Monitoring*. 11, 1253-1258.
- Landmeyer J. E., Tanner T. L., Watt B. E. (2004). Biotransformation of tributyltin to tin in freshwater river-bed sediments contaminated by an organotin release. *Environmental Science and Technology*. 38, 4106-4112.
- Lima-Verde F. B., Castro Í. B., Rocha-Barreira C. d. A. (2010). Imposex occurrence in *Nassarius vibex* from South America: a potential bioindicator in estuarine environments. *Marine Biodiversity Records*. 3, null.
- Limaverde A. M., de L. R. W., Fernandez M. A., de L. S., Coutinho R. (2007). Stramonita haemastoma as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. *Marine Environmental Research*. 64, 384-398.
- Madhusree B., Tanabe S., Ozturk A. A., Tatsukawa R., Miyazaki N., Ozdamar E., Aral O., Samsun O., Ozturk B. (1997). Contamination by butyltin compounds in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*) from the black sea. *Frenesius Journal Anallitical Chemistry*. 359, 244-248.
- Maguire R. J. (1984). Butyltin compounds and inorganic tin in sediments in Ontario. *Environmental Science and Technology*. 18, 291-294.
- Manzo S., Buono S., Cremsini C. (2008). Predictability of copper, irgarol, and diuron combined effects on sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 54, 57-68.
- Marinha do Brasil DdPeC. Normas da autoridade arítima para o controle de sistemas antiincrustantes em embarcações. NORMAM-23/DPC. 2007.
- Matthiessen P., Gibbs P. E. (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17, 37-43.
- Michaud M. H., Pelletier E. (2006). Sources and fate of butyltins in the St. Lawrence Estuary ecosystem. *Chemosphere*. 64, 1074-1082.
- Miloslavich P., Penchaszadeh P. E., Bigatti G. (2007). Imposex in gastropods from Venezuela. *Ciencias Marinas*. 33, 319-324.
- Minchin A., Minchin D. (1997). Dispersal of TBT from a fishing port determined using the dogwhelk *Nucella lapillus* as an indicator. *Environmental Technology*. 18, 1225-1234.

- Minchin D., Stroben E., Oehlmann J., Bauer B., Duggan C. B., Keatinge M. (1996). Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Marine Pollution Bulletin*. 32, 188-195.
- Mora S. J., Phillips D. R. (1997). Tributyltin (TBT) pollution in riverine sediments following a spill from a timber treatment facility in Henderson, New Zealand. *Environmental Technology*. 18, 1187-1193.
- Nhan D. D., Loan D. T., Tolosa I., De Mora S. J. (2005). Occurrence of butyltin compounds in marine sediments and bivalves from three harbour areas (Saigon, Da Nang and Hai Phong) in Vietnam. *Applied Organometallic Chemistry*. 19, 811-818.
- Nogueira J. M. F., Simplicio B., Florencio M. H., Bettencourt A. M. M. (2003). Levels of tributyltin in sediments from Tagus estuary nature reserve. *Estuaries*. 26, 798-802.
- Oliveira C. R., Santos D. M., Santos Madureira L. A., Marchi M. R. R. (2010). Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. *Journal of Hazardous Materials*. 181, 851-856.
- Omae I. General Aspects of Natural Products Antifoulants in the Environment. In: Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides. (Ed. Konstantinou IK). Berlin: Springer-Verlag, 2006; 227-262.
- Paul J. D., Davies I. M. (1986). Effects of copper and tin-based anti-fouling compounds on the growth of scallops *Pecten maximus* and oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 54, 191-203.
- Penchaszadeh P. E., Averbuj A., Cledon M. (2001). Imposex in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*. 42, 790-791.
- Pinochet H., Tessini C., Bravo M., Quiroz W., De Gregori I. (2009). Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay, Chile. *Environmental Monitoring and Assessment*. 155, 341-353.
- Porte C., Janer G., Lorusso L. C., Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M. P., Fossi M. C., Canesi L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 143, 303-315.
- Queiroz L., Castro I. B., Rocha-Barreira C. A. (2007). New Imposex Development Index (IDI) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): A Transplantation Experiment in the Brazilian Northeast. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 2, 249-256.
- Rato M., Gaspar M. B., Takahashi S., Yano S., Tanabe S., Barroso C. (2008). Inshore/offshore gradients of imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*. 56, 1323-1331.
- Santos D. M., Araújo I. P., Machado E. C., Carvalho-Filho M. A. S., Fernandez M. A., Marchi M. R. R., Godoi A. F. (2009). Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 1926-1931.
- Shi H. H., Huang C. J., Zhu X. S., Yu X. J., Xie W. Y. (2005). Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Marine Ecology Progress Series*. 304, 179-189.
- Sousa A., Laranjeiro F., Takahashi S., Tanabe S., Barroso C. M. (2009). Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere*. 77, 566-573.
- Sternberg R., Gooding M., Hotchkiss A., LeBlanc G. (2010). Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*. 19, 4-23.

- Stroben E., Schulte-Oehlmann U., Fioroni P., Oehlmann J. (1995). A comparative method for easy assessment of coastal TBT pollution by the degree of imposex in prosobranch species. *Haliotis*. 24, 1-12.
- Sudaryanto A., Takahashi S., Tanabe S., Muchtar M., Razak H. (2000). Occurrence of butyltin compounds in mussels from Indonesian coastal waters and some Asian countries. *Water Science and Technology*. 42, 71-79.
- Swennen C., Ruttanadakul N., Ardseungnern S., Singh H. R., Mensink B. P., ten Hallers-Tjabbes C. C. (1997). Imposex in sublittoral and littoral gastropods from the Gulf of Thailand and strait of Malacca in relation to shipping. *Environmental Technology*. 18, 1245-1254.
- Takahashi K. Release Rate of Biocides from Antifouling Paints. In: *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. (Eds. Arai T, Harino H, Ohji M, Langston WJ). Tokyo: Springer, 2009; 3-22.
- Takahashi S., Tanabe S., Kawaguchi K. (2000). Organochlorine and butyltin residues in mesopelagic myctophid fishes from the western North Pacific. *Environmental Science and Technology*. 34, 5129-5136.
- Tanabe S., Prudente M., Mizuno T., Hasegawa J., Iwata H., Wata H. (1998). Butyltin contamination in marine mammals from North Pacific and Asian coastal waters. *Env Sci Tech*. 32, 193-198.
- Tanabe S, Subramanian A N. Bioindicators of POPs: Monitoring in developing countries. Kyoto University Press and Trans Pacific Press, Melbourn 2006.
- Tanabe S. (1999). Butyltin Contamination in Marine Mammals - A Review. *Marine Pollution Bulletin*. 39, 62-72.
- Teso S. V., Penchaszadeh P. E. (2009). Beach filling and imposex in *Olivancillaria deshaysiana* (Mollusca: Gastropoda: Olividae) from the coast of Mar del Plata, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 89, 557-562.
- Thomas K. V., Fileman T. W., Readman J. W., Waldock M. J. (2001). Antifouling Paint Booster Biocides in the UK Coastal Environment and Potential Risks of Biological Effects. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 677-688.
- Watanabe N., Sakai S., Takatsuki H. (1992). Examination for Degradation Paths of Butyltin Compounds in Natural-Waters. *Water Science and Technology*. 25, 117-124.
- Watermann B. T., Daehne B., Sievers S., Dannenberg R., Overbeke J. C., Klijnstra J. W., Heemken O. (2005). Bioassays and selected chemical analysis of biocide-free antifouling coatings. *Chemosphere*. 60, 1530-1541.
- Wilson S. P., Ahsanullah M., Thompson G. B. (1993). Imposex in Neogastropods - An Indicator of Tributyltin Contamination in Eastern Australia. *Marine Pollution Bulletin*. 26, 44-48.
- Yebra D. M., Kiil S., Dam-Johansen K. (2004). Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*. 50, 75-104.
- Zhang A. Q., Leung K. M. Y., Kwok K. W. H., Bao V. W. W., Lam m. H. W. (2008). Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. *Marine Pollution Bulletin*. 57, 575-586.

## **Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático**

Ítalo B. Castro\*, Eliete Westphal & Gilberto Fillmann

Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália, km 8,  
Rio Grande, RS, 96201-900, Brasil. \*Italo\_braga@yahoo.com.br

### **Abstract**

Antifouling agents have been used on vessels and boats since ancient civilizations. Thus, a brief history on the three generations of antifouling paints was provided in the present review. Additionally, information about physic-chemical properties, environmental levels, toxicology and analytical methods was discussed for the 16 “new” booster biocides used as third-generation antifouling paints. The main problems, limitations and future trends related to this subject were also presented. Finally, actions were suggested in order to appraise the current status of the environmental impact caused by these compounds in South America.

**Keywords:** antifouling, paint, booster biocides, review

## Introdução

Dentre os diversos grupos de contaminantes orgânicos potencialmente danosos a ecossistemas aquáticos, despontaram nos últimos anos os biocidas utilizados como princípio ativo de tintas anti-incrustantes. Essas tintas são aplicadas como sistemas de proteção, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes (“*fouling*”) sobre superfícies expostas à água. Usualmente, tintas anti-incrustantes são aplicadas em embarcações comerciais e de passeio, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados a aquicultura, dentre outras estruturas.<sup>1</sup>

Dentre as aplicações mencionadas para as referidas tintas, a utilização como revestimento protetor em embarcações tem sido apontada por muitos autores como a mais impactante para o ambiente devido ao seu caráter altamente difundido em zonas costeiras.<sup>2</sup>

Segundo Kotrikla<sup>3</sup> o emprego de sistemas anti-incrustantes em embarcações é justificado pelos seguintes motivos: (a) o aumento da fricção entre o casco e a água, demandando uma maior potência dos motores e, conseqüentemente, gerando um aumento no consumo de combustível; (b) aumento da frequência de docagens, gerando um incremento de custos e de resíduos gerados; (c) aumento das taxas de corrosão e (d) introdução não intencional de espécies exóticas em ambientes aquáticos.

O primeiro registro de uso de sistemas anti-incrustantes data de dois mil anos atrás, quando os cascos de madeira eram revestidos com chumbo e “untados” com misturas de óleo de baleia, enxofre e arsênio. Em 1625, por sua vez, uma receita letal combinando arsênio, cobre e goma em pó foi patenteada como agente anti-incrustante por Wilian Beale na Inglaterra. A utilização de sistemas anti-incrustantes incorporados às tintas passou a ser comum, e cada vez mais frequente, na medida em que os cascos de madeira das

embarcações foram substituídos por cascos metálicos, fato ocorrido em meados do século XVIII. A partir de então, a navegação comercial e o uso de embarcações de lazer se tornaram cada vez mais populares, aportando aos ambientes aquáticas quantidades cada vez maiores de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes.<sup>1</sup>

Em meados do século XX, os óxidos de cobre e de zinco foram os primeiros biocidas utilizados regularmente em tintas anti-incrustantes<sup>4</sup> sendo, portanto, denominados de primeira Geração.<sup>5</sup> No entanto, a durabilidade destas tintas à base óxidos metálicos se restringia ao máximo de um ano após sua aplicação.

Como consequência desta rápida perda da eficiência, em 1961 foi desenvolvida a primeira tinta anti-incrustante à base de um composto organoestânico (COEs).<sup>6</sup> Essas tintas, conhecidas como de segunda geração,<sup>5</sup> utilizavam como princípio ativo os compostos tributilestanho (TBT) e/ou trifenilestanho (TPT). Foram amplamente empregadas e, na década de 1980, chegaram a revestir 90% dos cascos dos navios em operação no mundo. A preferência por estes anti-incrustantes se deu principalmente devido a sua grande eficiência e durabilidade.<sup>2</sup> Devido a sua utilização, no caso de embarcações que utilizavam tintas de auto polimento por exemplo, o período entre docagens aumentou para cerca de 7 anos. Com isso, diminuíram significativamente os custos de manutenção com as embarcações.<sup>2</sup>

Apesar da grande eficiência das tintas anti-incrustantes de segunda geração, diversos problemas relacionados à sua elevada toxicidade ambiental começaram a surgir já na década de 1980. O primeiro caso em que se comprovou a ação tóxica dos compostos organoestânicos ocorreu em ostras da baía de Arcachon (França), uma área cercada por marinas e pequenos portos.<sup>7,8</sup> Nesses animais foram observados uma série de efeitos deletérios, como diminuição do número de jovens recém fixados, anomalias de desenvolvimento nas larvas e uma alteração das conchas denominado “*balling*”. Porém, o

efeito biológico mais conhecido, relacionado à exposição aos COEs, é o imposex. Este fenômeno caracteriza-se pelo surgimento de estruturas sexuais secundárias masculinas em fêmeas de moluscos prosobrânquios, que por ser extremamente específico e de fácil quantificação, vem sendo utilizado mundialmente como biomarcador de áreas contaminadas por esses compostos.<sup>9</sup>

Devido a sua elevada toxicidade a espécies não-alvo, a utilização de COEs em tintas anti-incrustantes foi banida pela Organização Marítima Internacional (*International Maritime Organization* – IMO).<sup>2</sup> O processo de banimento iniciou no ano de 2003, quando foram internacionalmente proibidas novas aplicações dessas tintas. Além disso, foi estabelecido o prazo limite de setembro de 2008 para remoção desses revestimentos de estruturas em operação, bem como o banimento do tráfego das embarcações ainda revestidas com estas tintas à base de COEs.<sup>10,11</sup> Por outro lado, é sabido que alguns países em desenvolvimento seguem utilizando estes compostos.<sup>12</sup>

Em razão dos problemas ambientais associados ao uso de tintas à base de organoestânicos, e seu gradativo banimento mundial, uma terceira geração de tintas anti-incrustantes começou a ser utilizada a partir de 1987. Esse novo grupo de tintas contempla atualmente 16 diferentes compostos biocidas que estão homologados pela IMO para utilização em embarcações (Tabela 1).<sup>13</sup> Estes compostos pertencem a diferentes grupos químicos e, em alguns casos, podem ser utilizados concomitantemente (até 4 deles) em uma mesma formulação comercial.<sup>14</sup>

Dentre os biocidas incorporados nos anti-incrustantes de terceira geração encontram-se compostos orgânicos não metálicos como: Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine, Clorotalonil, Diclofluanida, Tiram, Busan (TCMTB), TCMS Piridina e Trifenilbornano Piridina. Já os compostos metálicos (orgânicos e inorgânicos) homologados para utilização



são: Zinco Piritiona, Cobre Piritiona, Ziram, Maneb, Óxido Cuproso, Tiocianato de Cobre e Naftenato de Cobre (Tabela 1).<sup>1</sup>

Tabela 1: Grupo de 16 biocidas homologados pela IMO para utilização em tintas anti-incrustantes.

<b>Biocida</b> (Nome químico / CAS)	<b>Estrutura</b>	<b>Biocida</b> (Nome químico / CAS)	<b>Estrutura</b>
Irgarol 1051 (-metiltio-4-terc-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) Nº CAS 28159-98-0		Trifenilborano Piridina / TPBP Nº CAS 971-66-4	
Diuron (3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea) Nº CAS 330-54-1		Cobre Piritiona / CP (Cobre,bis(1,hydroxi-2(1H)-piridinationato O,S)) Nº CAS 14915-37-8	
DCOIT (4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona) Nº CAS 64359-81-5		Zinco Piritiona / ZP (Zinco, bis-(hidroxi-2(1H)-piridinationato-O,S)) Nº CAS 13463-41-7	
Clorotalonil (2,4,5,6-Tetracloroisofталонitrila) Nº CAS 1897-45-6		Ziram (Zinco dimetil ditiocarbamato) Nº CAS 137-30-4	
Diclofluanida (N,N-Dimetil-N-fenil-N-(diclorofluorometiltio)sulfamid a) Nº CAS 1085-98-9		Maneb (Manganesetileno bis(ditiocarbamato) (polimérico)) Nº CAS 12427-38-2	
Tiram (Tetrametiltiuram disulfida) Nº CAS 137-26-8		Óxido Cuproso CAS 1317-39-1	
TCMTB / Busan (2-(tiocianometiltio) benzotiazol) Nº CAS 21564-17-0		Tiocianato de cobre Nº CAS 1111-67-7	
TCMS Piridina / Densil ((2,3,3,6-tetracloro-4-metilsulfonyl) piridina) Nº CAS 13108-52-6		Naftenato de Cobre Nº CAS 1338-02-9	

Na maioria das tintas anti-incrustantes disponíveis no mercado mundial, esses compostos são quimicamente associados a uma matriz acrílica solúvel e atuam como biocidas ou potencializadores do efeito biocida gerado pelos metais presentes na tinta.<sup>2</sup> Esse tipo de associação promove taxas de liberação constantes dos biocidas ao longo do tempo, elevando assim a durabilidade dos revestimentos.<sup>2</sup>

Em razão da crescente utilização destes biocidas de terceira geração, começaram a ser publicados estudos relacionando a sua ocorrência ambiental a áreas com intenso tráfego de embarcações.<sup>15,16</sup> Entretanto, a maior parte destes estudos têm sido realizados em áreas portuárias e marinas da Europa,<sup>17</sup> Estados Unidos da América<sup>18</sup> e Japão,<sup>19</sup> existindo, até o momento, somente dois estudos do gênero para a América do Sul.<sup>20,21</sup>

Sendo assim, em razão da crescente relevância do tema, o presente trabalho tem por objetivo compilar informações a cerca das propriedades físico-químicas, comportamento e níveis ambientais, toxicidade, e metodologias analíticas desses 16 biocidas utilizados nas tintas anti-incrustantes de 3ª geração. Para tanto, os biocidas serão apresentados em dois grupos conforme a presença ou não de metais na sua composição (biocidas não-metálicos e metálicos).

### **Biocidas não Metálicos:**

#### Irgarol 1051

O Irgarol 1051 (2-metiltio-4-terc-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina) é um composto pertencente ao grupo das triazinas que apresenta solubilidade moderada em água (7 mg/L), coeficiente de partição octanol/água ( $\log K_{ow}$ ) de 3,95 e baixa taxa de degradação nessa matriz (Tabela 2). Estudos demonstraram que esse composto permanece intacto por períodos de até 36 dias em amostras de água e que particionam preferencialmente nos sedimentos.<sup>22</sup> Após esse período, o Irgarol 1051 pode ser hidrolisado em diferentes

metabólitos: M1 (2-metiltio-4-terc-butilamino-6-amino-s-triazina), M2 (2-amino-propanal-4-terc-butilamino-6-metiltio-s-triazina) e M3 (2,4(diamino-di-terc-butil)-6-metiltio-s-triazina). Apesar do M1 ser o metabólito preferencialmente formado, as suas concentrações ambientais (ex.: marinas) são normalmente mais baixas do que o Irgarol.<sup>23</sup> Isso sugere que a taxa de transformação de Irgarol a M1 é relativamente lenta e/ou que a taxa de degradação deste metabólito é maior do que a de sua formação.<sup>24</sup>

Tabela 2: Principais propriedades físico-químicas dos 16 biocidas usados em anti-incrustantes de Terceira geração. (**S.A.**, solubilidade em água; **M.M.**, massa molecular; **P.V.**, Pressão de vapor; **P.E.**, Ponto de ebulição).

<b>Biocida</b>	<b>log K<sub>ow</sub></b>	<b>S.A. (mg/L)</b>	<b>M.M.</b>	<b>P.V. (Pa)</b>	<b>P.E. (°C)</b>
<b><i>Não metálicos</i></b>					
Irgarol 1051	3,95	7	253,4	1,5x10 <sup>-5</sup>	428,0
Diuron	2,85	36,4	233,1	4,1x10 <sup>-4</sup>	385,2
DCOIT	2,85	0,0065	213,3	4,0x10 <sup>-4</sup>	322,6
Clorotalonil	2,64	0,6	265,9	1,3x10 <sup>-5</sup>	350,5
Diclofluanida	3,70	0,006	333,2	1,3x10 <sup>-4</sup>	336,8
Tiram	1,70	30,0	240,4	NE	307,4
TCMTB	3,30	45,0	238,4	1,0	NA
TCMS Piridina	NE	0,025	294,9	NE	451,1
Trifenilborano Piridina	NE	1,0	321,2	1,3x10 <sup>-4</sup>	348,0
<b><i>Metálicos</i></b>					
Cobre Piritiona	0,97	<1	315,9	NE	253,8
Zinco Piritiona	0,97	6,0	317,7	1,33x10 <sup>-4</sup>	262,0
Ziram	1,23	17,0	305,8	NE	248,0
Maneb	NE	6,0	265,3	NE	308,2
Óxido Cuproso	NE	NE	145,1	NE	1800,0
Tiocianato de Cobre	NE	NE	179,7	NE	146,0
Naftenato de Cobre	NE	NE	405,9	NE	250,0

Dados obtidos de Voulvoulis et al.<sup>27</sup>; Sakkas<sup>95</sup>; van Wezel e Vlaardingen<sup>60</sup>; Thomas e Brooks<sup>89</sup> e Harino<sup>75</sup>; NE: dados não encontrados na literatura; NA: não aplicável, visto que esse composto se decompõe abaixo do ponto de ebulição.

Em sedimentos, a degradação do Irgarol é lenta mesmo sob condições aeróbias, com tempos de meia vida de 100 e 200 dias para os sedimentos marinhos e de água doce, respectivamente. Essas taxas são consideravelmente mais lentas em condições anaeróbias.<sup>25</sup>

O Irgarol é o biocida utilizado em anti-incrustantes mais frequentemente detectado no mundo, tendo sido primeiramente reportado como contaminante aquático em 1993 na Cote d'Azur (França).<sup>26</sup> Estudos em águas costeiras e continentais indicam uma ocorrência bastante difundida nesses ambientes.<sup>27</sup> Estudos realizados nos Estados Unidos, Europa e Ásia tem demonstrado elevadas concentrações desse composto em amostras de água, com valores de até 1.300 ng/L nas Ilhas Virgens, 1.700 ng/L na Cote d'Azur na França e 4.200 ng/L em Singapura.<sup>18,28,29</sup> Também tem sido reportada a ocorrência ambiental do metabólito M1 com concentrações variando entre 1 e 4.000 ng/L em amostras de água oriundas de marinas da Ásia, Europa e Estados Unidos.<sup>30-32</sup>

A ocorrência de Irgarol 1051 em amostras de água do mar tem sido globalmente relacionada a áreas onde se observa fluxo de embarcações, sobretudo em marinas e portos pesqueiros. Zonas exclusivamente portuárias (onde trafegam embarcações de grande porte) têm apresentado concentrações proporcionalmente mais baixas quando comparadas a essas áreas.<sup>33</sup> Adicionalmente, os níveis de Irgarol variam sazonalmente conforme as atividades náuticas na Europa, evidenciando a ampla utilização deste composto em tintas anti-incrustantes aplicadas a embarcações de pequeno porte.<sup>34</sup> No Brasil, determinações realizadas em amostras de água dos Rio Paraíba do Sul<sup>21</sup> e do canal do São Gonçalo<sup>20</sup> revelaram níveis extremamente baixos, porém detectáveis, de Irgarol. Em ambas as áreas foi observada a presença de tráfego de embarcações.

Alguns estudos conduzidos com amostras de sedimentos obtidas em portos e marinas encontraram valores de Irgarol de até 113 ng/g na baía de Otsuchi (Japão),<sup>19</sup> 220

ng/g no mar Báltico e 1.011 ng/g no estuário Blackwater (Reino Unido).<sup>18,35</sup> No Brasil, níveis de concentração variando entre 0,2 e 5,8 ng/g foram detectados em amostras de sedimentos obtidos em uma zona portuária localizada o estuário da Lagoa do Patos no Rio Grande do Sul.<sup>36</sup>

O Irgarol 1051 é um potente inibidor da atividade fotossintética, atuando principalmente sobre o fotossistema II. Esse composto promove a inibição da fixação de carbono, provocando uma redução na produção de carboidratos por seres autotróficos.<sup>37</sup> Desta forma, seu efeito é mais pronunciado em organismos fitoplanctônicos.<sup>38</sup> Esse fato tem sido confirmado por testes de toxicidade, onde foi verificado, por exemplo, uma CE<sub>50</sub> (120h) de 0,43 µg/L para a diatomácea *Skeletonema costatum* e de 0,56 µg/L para a clorofícea *Dunaliella tertiolecta*. Já para espécies de peixe, como *Menidia beryllina* e *Cyprinodon variegatus*, os valores de CL<sub>50</sub> (96h) foram de 1.580 µg/L e 3.500 µg/L, respectivamente. Adicionalmente testes ecotoxicológicos realizados no Brasil com as espécies de crustáceos *Acartia tonsa* (48h), *Mysidopsis juniae* (96h) e *Kalliapseudes schubartii* (96h) resultaram em valores de CL<sub>50</sub> de 714, 310 e 5600 µg/L, respectivamente (Tabela 3).<sup>39</sup>

A determinação de Irgarol 1051 em níveis traço tem sido realizada por diferentes métodos analíticos. Este analito é normalmente extraído de matrizes aquosas por métodos que empregam a extração em fase sólida (EFS) ou extração líquido-líquido (ELL).<sup>40</sup> Para matrizes sólidas, como o sedimento, os métodos de extração mais aplicados utilizam Soxhlet ou sonificação.<sup>15</sup> Já a quantificação pode ser feita por cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia de fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) ou cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas (CL/EM). Entretanto, a separação do Irgarol dos seus

metabólitos apresenta uma melhor resolução por cromatografia líquida com ionização química a pressão atmosférica (CL/IQPA/EM) .<sup>41</sup>

Tabela 3: Toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração sobre diversos grupos de organismos. (CE, concentração efetiva, CL concentração letal).

<b>Biocida</b>	<b>Grupo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Efeito (tempo)</b>	<b>Concentração (µg/L)</b>
Irgarol 1051	Alga	<i>Skeletonema costatum</i>	CE <sub>50</sub> (120h)	0,43
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>		0,56
	Peixe	<i>Menidia beryllina</i>	CL <sub>50</sub> (96h)	1.580
		<i>Cyprinodon variegatus</i>		3.500
	Crustáceo	<i>Acartia tonsa</i>	CL <sub>50</sub> (48h)	714
		<i>Mysidopsis juniae</i>	CL <sub>50</sub> (96h)	310
<i>Kalliapseudes schubartii</i>			5600	
Diuron	Alga	<i>Chaetoceros gracilis</i>	CE <sub>50</sub> (72h)	36,0
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE <sub>50</sub> (96h)	0,7
	Crustáceo	<i>Artemia salina</i>	CE <sub>50</sub> (24h)	3.011
		<i>Acartia tonsa</i>	CL <sub>50</sub> (48h)	1.486
		<i>Mysidopsis juniae</i>	CL <sub>50</sub> (96h)	589
		<i>Kalliapseudes schubartii</i>		7.560
	Ouriço	<i>Paracentrotus lividus</i> ,	CE <sub>50</sub> (48h)	2.390
		<i>Lytechinus variegatus</i>	CE <sub>50</sub> (24h)	3.335
DCOIT	Alga	<i>Skeletonema costatum</i>	CL <sub>50</sub> (96h)	13,9
	Peixe	<i>Cyprinodon variegatus</i>		20,5
Clorotalonil	Alga	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE <sub>50</sub> (96h)	64,0
	Peixe	<i>Pimephales promelas</i>	CL <sub>50</sub> (96h)	22,6
Diclofluanida	Bactéria	<i>Vibrio fisheri</i>	CE <sub>50</sub> (15 min)	15,7
	Alga	<i>Selenastrum capricornotum</i>	CE <sub>50</sub> (72h)	21
	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> (48h)	1.330
	Molusco	<i>Mytilus edulis</i>		81
	Ouriço	<i>Paracentrotus lividus</i>		627
	Nematódeo	<i>Ciona intestinalis</i>	CE <sub>50</sub> (24h)	283
Tiram	Alga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CE <sub>50</sub> (96h)	1.000
	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CL <sub>50</sub> (48h)	210
	Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CE <sub>50</sub> (60dias)	0,64
TCMTB	Bactéria	<i>Vibrio fisheri</i>	CE <sub>50</sub> (15 min)	58,0
	Alga	<i>Selenastrum capricornotum</i>	CE <sub>50</sub> (30h)	7,8
	Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	CE <sub>50</sub> (48h)	6,8
TPBP	Alga	<i>Skeletonema costatum</i>	CL <sub>50</sub> (72h)	2,2
	Crustáceo	<i>Artemia salina</i>		130
Piritonas Metálicas	Crustáceo	Várias espécies	CL <sub>50</sub>	> 100
Ziram	Alga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CE <sub>50</sub> (96h)	1.200
	Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CE <sub>50</sub> (60 dias)	1,5

## Diuron

O Diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) é um herbicida do grupo das feniluréias que vem sendo utilizado na agricultura desde 1950,<sup>1</sup> sendo empregado em tintas anti-incrustantes a partir da década de 1980.<sup>42</sup> É um composto não iônico, com moderada solubilidade em água (36,4 mg/L) e coeficiente de partição octanol/água (log  $K_{ow}$ ) de 2,85 (Tabela 2). Esse composto é estável a oxidação e atua como inibidor da fotossíntese em diversas espécies.<sup>29</sup> Sua taxa de hidrólise é insignificante em um pH neutro, mas aumenta sob circunstâncias fortemente ácidas ou alcalinas. Estudos experimentais demonstram que sua meia vida em ambiente aquático encontra-se entre 14 e 27 dias.<sup>18</sup> Apesar do seu uso na agricultura, concentrações mais elevadas de Diuron em água do mar que as observadas em águas doces indicam que a sua fonte está relacionada à utilização como agente anti-incrustante.<sup>43</sup> Elevadas concentrações associadas ao seu uso em tintas anti-incrustantes tem sido encontrados em amostras de água obtidas em marinas na Europa, as quais apresentam seus picos nos períodos em que as embarcações de lazer estão sendo utilizadas.<sup>44</sup> Valores de até 6.742, 2.000 e 1.130 ng/L foram encontrados em águas da baía de Southampton (Inglaterra)<sup>45</sup>, e em marinas na região costeira da Catalúnia (Espanha)<sup>32</sup> e na costa da Holanda,<sup>44</sup> respectivamente. Tais resultados são provavelmente consequência do grande fluxo de embarcações nessas regiões. Situação similar foi observada também em estudos na Inglaterra, Suécia, Portugal e Japão.<sup>46</sup> No Brasil, foram verificadas concentrações detectáveis (até 20,9 ng/g) de Diuron em amostras de água e sedimentos oriundas de áreas sob a influência dos terminais portuários localizados no interior do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS).<sup>36</sup>

Assim como o Irgarol 1051, o Diuron costuma apresentar toxicidade extremamente elevada para organismos fitoplanctônicos, tais como a diatomácea *Chaetoceros gracilis* ( $CE_{50}$  (72h) = 36,0  $\mu$ g/L ) e a clorofícea *D. tertiolecta* ( $CE_{50}$  (96h) = 0,7  $\mu$ g/L).<sup>47</sup> Em

contrapartida, apresenta níveis inferiores de toxicidade para invertebrados, como os observados para os microcrustáceos *Artemia salina* ( $CE_{50}$  (24h) = 3.011  $\mu\text{g/L}$ )<sup>47</sup>, *Acartia tonsa* ( $CL_{50}$  (48h) = 1.486  $\mu\text{g/L}$ ),<sup>39</sup> *Mysidopsis juniae* ( $CL_{50}$  (96h) = 589  $\mu\text{g/L}$ )<sup>39</sup> e *Kalliapseudes schubartii* ( $CL_{50}$  96h = 7.560  $\mu\text{g/L}$ ).<sup>39</sup> Adicionalmente, em testes de toxicidade visando verificar embriotoxicidade do Diuron sobre a espécie de ouriço *Paracentrotus lividus*, a  $CE_{50}$  (48h) obtida foi de 2.390  $\mu\text{g/L}$ .<sup>47,48</sup> Similarmente para espécie de ouriço *Lytechinus variegatus* os valores de  $CE_{50}$  (24h) obtidos foram de 3335  $\mu\text{g/L}$ .<sup>39</sup> Esses resultados refletem o fato do Diuron ter sido inicialmente desenvolvido para o combate de ervas daninhas, tendo seu mecanismo de atuação associado à inibição do fluxo de elétrons necessários a realização da fotossíntese nos organismos autotróficos (Tabela 3).<sup>47</sup> O Diuron tem sido normalmente analisado a partir de matrizes aquosas utilizando EFS, enquanto que a técnica mais frequentemente empregada para sedimentos é a agitação mecânica da amostra em solventes orgânicos como acetonitrila.<sup>49</sup> A identificação e quantificação é feita por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (CL/EM), podendo também ser utilizada a cromatografia a gás, com detector de espectrometria de massas (CG/EM). Neste último caso, é necessária uma etapa prévia de derivatização por alquilação com iodometano.<sup>40,50</sup>

#### DCOIT (Sea Nine 211)

O Sea-Nine 211 é uma mistura comercial que possui 30% do ingrediente ativo (4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona ou DCOIT) em xileno. Esse biocida, é um isotiazol que foi inicialmente sintetizado pela empresa “*Rohm and Haas*” em 1992, tendo sido homologado para utilização como agente anti-incrustante pela IMO, e recebido registro de utilização pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) em 1994.<sup>51</sup> Com respeito as características físico-químicas, o DCOIT possui baixa solubilidade em



água (0,0065 mg/L ), um  $K_{ow}$  de 2,85 e uma rápida taxa de degradação na água do mar (meia-vida de aproximadamente 1 hora).<sup>52</sup> Adicionalmente, forma complexos extremamente estáveis com os sedimentos, tornando-se pouco biodisponível e, conseqüentemente, apresenta um baixo fator de bioacumulação para organismos aquáticos. A degradação do DCOIT ocorre normalmente pela abertura da porção cíclica da molécula, o que reduz a toxicidade de seus subprodutos numa ordem de magnitude de 4 a 5 vezes. Em água do mar e nos sedimentos, a degradação acontece, sobretudo, pela ação de microrganismos, sendo a contribuição dos processos de hidrólise e de fotólise pouco significativos para essa transformação.<sup>51</sup> Desta forma, o Sea-Nine vem sendo considerado o agente anti-incrustante que apresentam menores danos ambientais.<sup>51,52</sup>

Os poucos estudos existentes apontam para níveis ambientais baixos. Segundo Harino *et al.*,<sup>19</sup> o DCOIT está entre os biocidas utilizados em anti-incrustantes de terceira geração detectados em menores níveis em amostras obtidas no litoral japonês. As concentrações detectadas variaram entre 2 e 28 ng/L no porto de Osaka e baías Maizuru e Hiroshima.<sup>19</sup> Já no litoral da Grécia foram detectados valores de até 49 ng/L,<sup>53</sup> não sendo detectado entretanto em amostras de água da baía de Southampton (Inglaterra).<sup>24</sup>

Toxicologicamente, o DCOIT demonstra elevada atividade antimicrobiana, sobretudo com relação a bactérias, fungos e algas.<sup>29</sup> Diferentemente do Diuron e do Irgarol 1051, os seus níveis de toxicidade para espécies do fitoplâncton e do zooplâncton, são muito parecidos. Visto que em testes realizados com a diatomácea *Skeletonema costatum* e com o peixe *Cyprinodon variegatus*, os valores de  $CL_{50}$  (96h) foram 13,9 e 20,5  $\mu$ g/L, respectivamente (Tabela 3).

Os métodos analíticos aplicados para determinação do DCOIT em amostras de água são, em sua maioria, a EFS e a microextração em fase sólida (MEFS).<sup>54</sup> Amostras de sedimentos são normalmente extraídas a partir de agitação mecânica com solventes

orgânicos como acetonitrila.<sup>49</sup> A identificação e quantificação deste biocida são normalmente realizadas através de cromatografia líquida (CL/EM), podendo também ser realizada por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG/EM)<sup>55</sup> ou detector de captura de elétrons (CG/DCE).<sup>41</sup>

### Clorotalonil

O Clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrila) é um organoclorado do grupo das isofaltonitrilas que é utilizado a mais de 30 anos como fungicida na agricultura mundial.<sup>27</sup> Sua utilização como biocida ativo em tintas anti-incrustantes iniciou após o banimento das tintas à base de organoestânicos.<sup>26</sup> Esse composto apresenta um  $K_{ow}$  de 2,64 (Tabela 2), uma baixa solubilidade em água (0,6 mg/L) e é extremamente susceptível a fotodegradação. Devido a essas características, apresenta uma meia vida de até 4 semanas em meio aquático. Sua fotodegradação pode ser ainda mais rápida dependendo da natureza do corpo d'água e de fatores como a concentração de material orgânico, como ácidos húmicos e fúlvicos.<sup>53</sup> Estudos conduzidos por Walker *et al.*<sup>56</sup> demonstraram que a degradação do Clorotalonil é mais rápida em água estuarina e marinha do que em água esterilizada, sugerindo também uma contribuição microbiana nos processos de degradação desse composto. Em sedimentos, a meia vida do Clorotalonil costuma ser maior do que em água, apresentando persistência de até 3 meses.<sup>27,57</sup> Quanto ao seu equilíbrio sortivo, estudos demonstraram que em pH 8 o Clorotalonil costuma adsorver-se ao material particulado.<sup>27</sup>

De acordo com os resultados obtidos por diversos estudos, a ocorrência ambiental de Clorotalonil não segue o mesmo padrão de distribuição dos demais biocidas utilizados em formulações de tintas anti-incrustantes. Devido ao seu uso agrícola ser bastante difundido,<sup>46</sup> sendo frequentemente detectado em solos plantados, poucos estudos relacionam a presença de Clorotalonil à utilização em tintas anti-incrustantes. Em função

de suas propriedades físico-químicas, baixas concentrações desse composto têm sido detectadas na coluna d'água. Estudos realizados na Europa encontraram valores de Clorotalonil abaixo dos níveis de detecção das técnicas empregadas,<sup>15,53,58</sup> sendo os maiores valores reportados para algumas marinas da Grécia ( $\leq 120$  ng/L) e para o estuário Blackwater (Inglaterra) ( $\leq 1.380$  ng/L). Entretanto, Sakkas *et al.*<sup>38</sup> e Voulvoulis *et al.*<sup>59</sup> reportaram concentrações de até 126 e 34,3 ng/g em sedimentos de marinas na Grécia e no estuário Blackwater, respectivamente.

A elevada toxicidade do Clorotalonil está diretamente relacionada à presença de múltiplos centros eletrofilicos reativos na molécula. Segundo vários trabalhos, espécies de água doce e salgada não mostram diferenças significativas entre os níveis de toxicidade para esse composto.<sup>60</sup> Em testes de toxicidade realizados com espécies marinhas foi obtida para diatomácea *D. tertiolecta* uma  $CE_{50}$  (96h) de 64  $\mu\text{g/L}$ ,<sup>47</sup> e para espécie de peixe *Pimephales promelas* foi observada uma  $CL_{50}$  (96h) de 22,6  $\mu\text{g/L}$  (Tabela 3).<sup>47</sup> Estes resultados sugerem uma toxicidade ligeiramente maior para espécies animais, fato que pode ser justificado pela forte interação do Clorotalonil com determinadas enzimas de respiração celular.<sup>61</sup>

A etapa de extração de Clorotalonil a partir de amostras de água utiliza usualmente EFS ou ELL. Para sedimentos, tem sido empregada a sonificação da amostra em solventes orgânicos como acetona. A quantificação do composto é feita normalmente por CG com um detector de captura de elétrons (DCE). Porém, em virtude de sensibilidade, versatilidade e seletividade do CG/EM, essa técnica passou recentemente a ser bastante empregada.<sup>41</sup>

## Diclofluanida

A Diclofluanida (N,N-Dimetil-N-fenil-N-(diclorofluorometilthio) sulfamida), pertence ao grupo químico dos organoclorados, apresenta uma baixa solubilidade em água

(0,006 mg/L) e um  $K_{ow}$  de 3,7 (Tabela 2).<sup>62</sup> Em razão das suas características físico-químicas, apresenta uma grande afinidade por material particulado e sedimentos.<sup>18</sup> Além disso, em ambientes aquáticos com pH em torno de 8, a Diclorofluanida tem sua tendência a adsorver ao material particulado e aos sedimentos aumentada.<sup>27</sup> Esse composto mostra uma rápida taxa de degradação em água, apresentando uma meia vida de poucas horas nessa matriz. Ao se degradar, normalmente a Diclofluanida origina a N,N-Dimetilaminosulfanilida (DMSA), sendo que os principais fatores envolvidos são a concentração de matéria orgânica, o pH do meio, a atividade microbiana e a incidência de luz.<sup>63</sup> Este biocida é também suscetível à degradação anaeróbica em sedimento, o que representa uma forma significativa de sua remoção do ambiente.<sup>27</sup>

A Diclofluanida não tem sido comumente detectada em amostras de água. Na Europa e na América do Norte diversos estudos realizados com amostras de água obtidas em marinas e zonas portuárias encontraram concentrações inferiores aos limites de detecção das técnicas empregadas.<sup>38,58</sup> Entretanto concentrações de até 214 ng/L foram reportadas para algumas marinas na Grécia.<sup>18</sup> Por outro lado, concentrações consideravelmente elevadas foram observadas em amostras de sedimentos costeiros oriundos de marinas. Em sedimentos obtidos no estuário de Blackwater (Inglaterra) foram determinadas concentrações de até 688 ng/g, enquanto que na Ásia as concentrações variaram entre < 0,4 até 14 ng/g para Baía Otsuchi (Japão) e entre < 0,1 até 13 ng/g na costa do Vietnã.<sup>35</sup> Adicionalmente, foram verificados picos de Diclofluanida imediatamente após as temporadas de intensa atividade náutica na Europa. Isso reforça a hipótese de uma fonte deste composto para o meio marinho estar ligada a utilização de tintas anti-incrustantes.<sup>24</sup>

No que diz respeito à toxicologia, em um estudo realizado por Bellas<sup>64</sup> expondo larvas de três espécies de invertebrados marinhos a Diclofluanida, os valores de toxicidade

obtidos para o molusco *Mytilus edulis*, o ouriço *Paracentrotus lividus* e o nematódeo *Ciona intestinalis* foram  $CE_{50}$  (48h) = 81  $\mu\text{g/L}$ ,  $CE_{50}$  (48h) = 627  $\mu\text{g/L}$  e  $CE_{50}$  (24h) = 283  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Em outro estudo realizado com o microrganismo *Vibrio fisheri* (15 minutos), a alga *Selenastrum capricornotum* (72h) e o microcrustáceo *Daphnia magna* (48h), os valores de  $CE_{50}$  observados foram de 15,7, 21 e 1.330  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente (Tabela 3).<sup>65</sup> Com base nesses resultados, e no fato de que a Diclofluanida apresenta acentuado efeito carcinogênico e mutagênico,<sup>65</sup> pode-se concluir que esse composto possui uma toxicidade mais elevada sobre organismos unicelulares, os quais apresentam ciclo de vida rápido.<sup>47</sup>

Os métodos de extração aplicados em matrizes ambientais para determinação do Diclofluanida geralmente são a EFS para água, e a agitação mecânica com solventes orgânicos como a acetonitrila para sedimentos.<sup>35</sup> A quantificação da Diclofluanida é normalmente realizada por CG acoplada detectores seletivos como o de captura de elétrons (DCE) ou espectrometria de massas em modo de ionização química negativa.<sup>41</sup>

## Tiram

O Tiram (Tetrametiltiuram disulfida) é um ditiocarbamato usado principalmente na agricultura como fungicida no tratamento de folhas e sementes. Existem também registros de sua utilização na indústria de borracha, onde tem sido empregado como agente na vulcanização. Adicionalmente, a presença desse composto no ambiente pode ser também atribuída a processos de oxidação de dois outros fungicidas amplamente empregados: Derbam e Ziram.<sup>66</sup> O Tiram apresenta solubilidade moderada em água (30 mg/L) e um  $K_{ow}$  de 1,7 (Tabela 2).<sup>27</sup> A persistência do Tiram no ambiente aquático é fortemente influenciada pelo pH do meio, sendo degradado por hidrólise e fotólise. O tempo de meia vida deste composto é inferior a 24 horas em pH 9, aumentando para 77 dias em pH 5. Já em relação à fotodegradação, o tempo de meia vida é de 8,8 horas a um pH de 5,5, ou seja,

sob irradiação solar o Tiram diminui significativamente sua persistência no ambiente aquático.<sup>53</sup>

Durante a realização do presente estudo não foram encontrados trabalhos reportando níveis de Tiram em amostras ambientais oriundas de ambientes aquáticos. Essa ausência de estudos ocorre possivelmente em virtude da sua rápida degradação nesse tipo de ambiente, dificultando a quantificação do mesmo.<sup>67</sup>

Assim como ocorre com outros ditiocarbamatos, o Tiram apresenta níveis de toxicidade mais elevados para espécies de vertebrados como peixes, do que para invertebrados ou algas. Em dois estudos envolvendo testes de toxicidade com as espécies dulcícolas *Chlorella pyrenoidosa* (clorofícea), *Daphnia magna* (microcurstáceo) e *Oncorhynchus mykiss* (peixe), os valores obtidos foram de 1.000 µg/L (CE<sub>50</sub> 96h), 210 µg/L (CL<sub>50</sub> 48h) e 0,64 µg/L (CE<sub>50</sub> 60dias), respectivamente (Tabela 3).<sup>68,69</sup> Adicionalmente, vários trabalhos têm atestado as propriedades teratogênicas e mutagênicas do Tiram e de outros ditiocarbamatos. Entre as alterações sub-letais mais frequentemente induzidas por esse composto encontram-se as distorções na notocorda de embriões de peixes. Estas distorções acarretam em deformidades na coluna vertebral ao final do desenvolvimento embrionário.<sup>70,71</sup>

Analiticamente, o Tiram pode ser determinado em matrizes ambientais através de técnicas de CG, empregando detectores como o captura de elétrons (DCE), o Fotométrico de Chama (DFC) e Espectrometria de Massa (EM). Adicionalmente, alguns estudos têm utilizado CLAE com detecção por ultravioleta (UV) para determinação analítica desse composto.<sup>72</sup> Para preparação de amostras de água, a EFS e a ELL tem sido as técnicas preferencialmente aplicadas.<sup>73</sup>

TCMTB (Busan)

O biocida TCMTB (2-(tiocianometiltio) benzotiazol]) é um tiazol que, além de ser usado em formulações de tintas anti-incrustantes, tem sido aplicado como herbicida na agricultura e fungicida na preservação de madeira e indústria de couro.<sup>27</sup> Apresenta moderada solubilidade em água (45 mg/L) e  $K_{ow}$  de 3,3 (Tabela 2). Não existem até o momento estudos descrevendo o equilíbrio sortivo do TCMTB em meio aquático.<sup>60</sup> Porém, em matrizes aquosas, esse composto, se degrada rapidamente por fotólise (1,5 a 3,9 horas). Essas características contribuem para a persistência extremamente baixa do TCMTB em ambientes aquáticos. A fotodegradação do TCMTB produz como principal metabólito o 2-mercaptobenzotiazol (MBT), apesar de traços de benzotiazol (BT) também serem originados no processo. A formação desses metabólitos, sobretudo o MBT, são especialmente importantes para estudos de toxicidade ambiental do TCMTB.<sup>53</sup>

Poucos monitoramentos da ocorrência ambiental do TCMTB têm sido publicados na literatura especializada. Em um estudo realizado por Thomas *et al.*,<sup>24</sup> não foi detectada a presença de TCMTB em nenhuma amostra de água e sedimentos oriundas de áreas portuárias e marinas do Reino Unido. O TCMTB também não foi detectado em amostras de água coletadas de marinas no sul da Espanha.<sup>54</sup>

De modo similar ao que se observa com relação a monitoramentos químicos do TCMTB, poucos estudos foram publicados sobre a toxicidade desse composto. Segundo Fernandez-Alba *et al.*<sup>65</sup>, o TCMTB atua como inibidor da cadeia de transporte de elétrons ao nível de mitocôndrias. Nesse mesmo estudo, testes de toxicidade realizados com o microrganismo *Vibrio fischeri*, com o microcrustáceo *Daphnia magna* e com a alga *Selenastrum capricornotum* revelaram valores de  $CE_{50}$  equivalentes a 58  $\mu\text{g/L}$  (15 min), 7,8  $\mu\text{g/L}$  (30h) e 6,8  $\mu\text{g/L}$  (48h), respectivamente (Tabela 3).

Os métodos analíticos normalmente empregados para análise do biocida TCMTB em amostras ambientais são CL/EM e CG/EM. A extração do TCMTB a partir de matrizes

aquosas é realizada através de EFS. Para, amostras de sedimentos tem sido empregada a agitação mecânica em diclorometano.<sup>5</sup>

#### TCMS Piridina (Densil)

O TCMS Piridina ((2,3,3,6-tetracloro-4-metilsulfonyl) piridina) passou a ser utilizado em formulações de tintas anti-incrustantes recentemente, porém esse composto era anteriormente empregado como fungicida na indústria têxtil e de couros.<sup>40</sup> Poucas informações sobre a físico-química do TCMS Piridina estão disponíveis na literatura especializada, entretanto, é sabido que sua solubilidade em água é extremamente baixa (0,025 mg/L).

Investigações realizadas sobre a ocorrência ambiental de novos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes detectaram traços de TCMS piridina em amostras ambientais de 4 diferentes estuários navegáveis do Reino Unido. As concentrações, entretanto, estavam abaixo dos limites de quantificação das técnicas empregadas.<sup>24</sup>

Do ponto de vista toxicológico o TCMS piridina é reconhecido como um potente inibidor da cadeia respiratória. Conseqüentemente, esse composto é capaz de bloquear a produção de trifosfato de adenosina (ATP) a nível mitocondrial, levando morte celular.<sup>74</sup>

Poucos trabalhos relatam metodologias analíticas para determinação do TCMS Piridina em amostras ambientais. Entretanto, Thomas<sup>55</sup> descreve um método para determinação desse composto em amostras de água usando pré-concentração por EFS, eluição com acetonitrila e posterior quantificação por CL/EM com ionização química negativa a pressão atmosférica.

#### Trifenilborano Piridina (TPBP)

O Trifenilborano Piridina é conhecido desde 1960, sendo utilizado em produtos com atividade bactericida, antifúngica e anti-incrustantes. No Japão, a introdução do TPBP



como agente anti-incrustante ocorreu em 1993. Poucas informações sobre a físico-química do TPBP estão disponíveis na literatura especializada, entretanto, sabe-se que sua solubilidade em água é relativamente baixa (aproximadamente, 1 mg/L).<sup>75</sup> As vias de degradação do TPBP em água envolvem principalmente processos de hidrólise e fotólise. Experimentos realizados com diferentes concentrações de TPBP revelaram que esse composto apresenta uma meia vida inferior a 34 dias. Similarmente, os principais produtos de degradação do TPBP (Hidróxido de difenilborano (DPB), Hidróxido de fenilborano (MPB), fenol, benzeno e o difenil), apresentam uma persistência extremamente baixa em água.<sup>53</sup>

Possivelmente devido a sua rápida degradação e a formação de metabólitos pouco persistentes, poucos estudos relatam concentrações ambientais desse composto. O TPBP foi detectado em amostras de água obtidas na Baía de Hiroshima no Japão. Entretanto, as concentrações foram inferiores ao limite de quantificação da técnica empregada.<sup>19</sup>

Praticamente inexistem estudos sobre a toxicologia do TPBP, exceção feita, a um estudo onde a alga *Skeletonema costatum* ( $CL_{50} 72h = 2,22 \mu g/L$ ) se mostrou mais sensível ao TPBP do que o microcrustáceo *Artemia salina* ( $CL_{50} 72h = 130 \mu g/L$ ) (Tabela 3). Neste mesmo estudo foi demonstrado também que os principais produtos de degradação do TPBP apresentam toxicidade bem inferior a do composto parental.<sup>76</sup>

A metodologia analítica normalmente empregada para determinação do TPBP utiliza pré-concentração por EFS, eluição com acetonitrila e a quantificação é realizada por CLAE acoplada a detector UV-visível (200nm) e fluorescência. Não existem até o momento métodos espectrometria de massas para determinação do TPBP.<sup>77</sup>

## **Biocidas metálicos:**

### Piritionas metálicas:

As piritionas metálicas à base de cobre e zinco são compostos que vem sendo largamente utilizados como biocidas a mais de 50 anos. Zinco Piritiona (Zinco, bis-(hidroxi-2(H)-piridinationato-O,S)), por exemplo, tem sido utilizado na agricultura como bactericida e fungicida, e na indústria de cosméticos em produtos com atividade anti-caspa, como xampus. Já o composto Cobre Piritiona (Cobre, bis(1, hidroxi-2(1H)-piridinationato O,S)) possui aplicações como bactericida e fungicida.<sup>78</sup>

Um aspecto marcante do comportamento ambiental do Zinco Piritiona (ZP), é sua grande susceptibilidade a sofrer reações de transquelação com cobre, ferro e, possivelmente, com manganês. Sendo assim, dependendo das concentrações disponíveis desses íons metálicos na água e nos sedimentos o ZP converte-se em Cobre Piritiona (CP).<sup>29</sup> Apesar disso, todos os complexos metálicos de piritionas são extremamente sensíveis a luz, sofrendo rápida dimerização por fotodegradação. Estudos experimentais demonstraram que sob irradiação UV, a meia vida do CP é de aproximadamente 29 minutos, enquanto que a do ZP é de 15 minutos.<sup>53</sup> Adicionalmente, esses compostos também sofrem degradação por hidrólise e por atividade microbiana, tornando suas meias vidas nos ambientes marinhos ainda mais curtas.<sup>29,79</sup> Devido a baixa disponibilidade de dados sobre sua ocorrência ambiental, o comportamento de sorção das piritionas metálicas é até o momento desconhecido.<sup>27</sup> Entretanto, a maior solubilidade do ZP (6 mg/L) em relação ao CP (< 1 mg/L) sugere que esses compostos particionam preferencialmente em compartimentos ambientais distintos. Dessa forma é mais provável encontrar resíduos de ZP em amostras de água, enquanto que para CP os sedimentos tendem a ser a matriz mais indicada para realização de monitoramentos.

Poucos monitoramentos têm sido realizados para piritionas metálicas no mundo. Em um único estudo conduzido por Thomas *et al.*,<sup>45</sup> concentrações de até 20 ng/L de ZP foram detectadas em amostras de água coletadas em marinas do Reino Unido. Já as concentrações de CP, um estudo realizado em sedimentos obtidos nas proximidades de áreas portuárias da costa norte do Vietnã, variaram entre <LQ (inferiores ao limite de quantificação da técnica) e 422 ng/g, encontrado em uma das estações situada nas proximidades de um terminal pesqueiro.<sup>80</sup> Em outro estudo realizado na costa do Japão, concentrações máximas de 8,6 ng/g de CP foram encontradas na baía de Otsushi.<sup>35</sup> A escassez de dados sobre a ocorrência ambiental do CP e do ZP ocorre, possivelmente, devido a elevada degradabilidade desses compostos, bem como pelas dificuldades analíticas enfrentadas durante sua determinação.

Diversos estudos sobre a toxicidade do CP e do ZP sobre organismos aquáticos têm sido publicados. Em crustáceos, os valores de CL<sub>50</sub> para as piritionas metálicas são geralmente superiores a 100 µg/L (Tabela 3).<sup>47</sup> Particularmente no caso do camarão *Heptacarpus futilirustris*, a CL<sub>50</sub> (96h) observada para ZP foi excepcionalmente elevada (2,5 µg/L).<sup>47</sup> Entretanto, a toxicidade do ZP e CP para espécies fitoplanctônicas e de peixes mostra-se maior que para crustáceos. Segundo Mochida e Fuji,<sup>47</sup> a elevada toxicidade das piritionas metálicas sobre espécies de peixes se justificada pela sua potentes ação como inibidores do transporte de membrana, que afeta diretamente a bomba de prótons necessária a respiração celular. No caso específico do CP ocorre um bloqueio da atividade neuromuscular, a qual é imprescindível durante o desenvolvimento embrionário desses organismos. Como consequência desses efeitos sub-letais, surgem deformações esqueléticas e formação de massas inflamatórias em peixes expostos por períodos de 50 dias a concentrações nominais de 2 a 4 µg/L desses compostos.

De modo geral, complexos metálicos de piritiona não são determinados por CG devido à sua baixa volatilidade e alta instabilidade térmica.<sup>81</sup> Dessa forma, as técnicas universalmente empregadas na determinação desses compostos em matrizes ambientais utilizam CL/EM com modo de ionização química a pressão atmosférica. Devido à tendência do ZP a sofrer transquelação em meios onde existam íons metálicos disponíveis, alguns métodos empregados na determinação desse composto induzem essa reação no intuito de formar moléculas mais estáveis e minimizar perdas durante as etapas de análise.<sup>78</sup> As técnicas de extração usualmente empregadas para amostras ambientais são EFS e agitação mecânica com solventes orgânicos para amostras de água e sedimentos, respectivamente.<sup>82</sup>

## Ziram

O Ziram (Zinco dimetilditiocarbamato) é um ditiocarbamato que é utilizado atualmente como fungicida agrícola para proteção de frutos e sementes, e como catalisador do processo de vulcanização e antioxidante na indústria de borracha.<sup>83</sup> Apresenta moderada solubilidade em água (17 mg/L) e um  $K_{ow}$  extremamente baixo (1,23).<sup>53</sup> Em virtude de suas propriedades físico-químicas, e de ser extremamente suscetível aos processos de hidrólise, fotólise e biodegradação, o tempo de meia vida do Ziram em ambientes marinhos é de, no máximo, 18 dias.<sup>60</sup>

Embora existam alguns estudos onde se realizaram monitoramentos do Ziram em amostras ambientais, nenhum destes relaciona a ocorrência do composto a sua nova utilização como princípio ativo em tintas anti-incrustantes.<sup>60,83</sup>

Assim como outros ditiocarbamatos, o Ziram exibe uma forte toxicidade sobre os estágios iniciais do desenvolvimento larval de peixes, sendo a deformação da notocorda o efeito mais frequentemente observado. Para a espécie de peixe dulcícola *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, a  $CE_{50}$  (60 dias) observada para esse composto foi de 1,5 µg/L. Por

outro lado, a CE<sub>50</sub> (96h) obtida para alga *C. pyrenoidosa* foi de 1.200 µg/L (Tabela 3).<sup>71</sup> Embora ainda não existam dados de toxicidade ao Ziram disponíveis para espécies de água salgada, esses resultados ilustram claramente a já mencionada sensibilidade das espécies de peixes a ditiocarbamatos.

A maioria dos métodos para determinação de ditiocarbamatos envolve a decomposição prévia dos analitos de interesse em disulfeto de carbono ou derivatização para metiltiocarbamatos, com posterior determinação por técnicas cromatográficas (CG ou CL). Esses métodos, entretanto, têm baixa seletividade devido às similaridades entre os diversos ditiocarbamatos. Sendo assim, foi desenvolvido recentemente um novo método para determinação direta do Ziram (sem derivatização) por CL/EM com modo de ionização química positiva a pressão atmosférica.<sup>84</sup> A EFS e a ELL são normalmente empregadas para extração do Ziram a partir de amostras de água.<sup>73</sup>

## Maneb

O Maneb ([etileno-bis-(ditiocarbamato)manganês]polimérico) é um ditiocarbamato polimérico que, além de ser utilizado em tintas anti-incrustantes, também possui aplicações na agricultura como fungicida. Embora seja um composto moderadamente solúvel em água (6 mg/L)<sup>85</sup> estudos experimentais revelaram que ele se decompõe rapidamente nessa matriz através de hidrólise e fotólise. Adicionalmente a degradação biológica tem pouca importância no seu comportamento ambiental.<sup>5</sup> Segundo esses estudos, a persistência do Maneb no ambiente é aproximadamente 10,5 horas. Os principais produtos de degradação do Maneb são a etilenouréia, o etileno bis isotiocianato sulfida e a carbamida.<sup>5,53</sup>

Algumas possíveis técnicas analíticas para determinação do Maneb em amostras ambientais foram discutidas por Voulvoulis *et al.*,<sup>86</sup> porém ainda não existem métodos para sua determinação rotineira.<sup>5</sup> O principal desafio analítico enfrentado para determinação desse composto é a seletividade do método. Isso ocorre em função do fato de existirem

compostos estruturalmente semelhantes ao Maneb, como é o caso do Zineb (zinco etileno bis (ditiocarbamato)), o qual também é um ditiocarbamato que tem aplicações na agricultura e em alguns produtos anti-incrustantes. Sendo assim, um método para determinação do Maneb em amostras ambientais deve ser capaz de diferenciá-lo de compostos similares que, eventualmente, podem está concomitantemente presentes nas amostras. Uma das soluções apontadas para esse problema seria a realização de uma análise paralela por espectrometria de absorção atômica a fim de diferenciar o magnésio do zinco permitindo a discriminação entre o Maneb e o Zineb.<sup>40</sup>

#### Biocidas à base de cobre

Os compostos cúpricos atualmente homologados pela IMO para utilização em tintas náuticas são: Óxido Cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), Tiocianato de Cobre ( $\text{CuSCN}$ ) e Naftenato de Cobre.<sup>14</sup> O emprego desses compostos ocorreu após o banimento mundial dos anti-incrustantes à base de COE. Nessa época, diversos produtos voltaram a incorporar em suas formulações grandes quantidades de compostos à base de cobre e/ou cobre metálico, com a finalidade de incrementar o efeito biocida dessas novas tintas. Sendo assim, a maioria dos produtos disponíveis no mercado mundial atualmente, utiliza o cobre associado a um ou mais dos biocidas mencionados anteriormente. Dessa forma, devido ao amplo espectro de toxicidade do cobre sobre organismos aquáticos, os demais compostos atuam como intensificadores do efeito biocida.<sup>87</sup>

A taxa de liberação do cobre contido em um revestimento anti-incrustante para coluna d'água está relacionada a diversos fatores de natureza física, química e biológica.<sup>87</sup> Adicionalmente, os níveis naturais desse elemento na coluna d'água e nos sedimentos não são conhecidos para muitas regiões. Sendo assim, avaliações realísticas sobre a contribuição das tintas anti-incrustantes para as concentrações de cobre observadas em zonas com intensa atividade naval são difíceis de serem realizadas. Porém, diferenças

significativas nas concentrações de cobre em sedimentos foram observadas entre áreas navegadas e não navegadas do Reino Unido. Nesse estudo, as concentrações verificadas em áreas relativamente pouco impactadas estavam entre 1 e 10 µg/g, enquanto que em áreas historicamente navegadas encontrou-se valores de até 3.000 µg/g.<sup>88</sup>

A toxicidade do cobre para organismos aquáticos está vinculada a fatores físico-químicos como pH, salinidade, teor de carbono orgânico dissolvido e concentração do metal. Isso ocorre, em virtude da tendência desse elemento em sofrer especiação originando diferentes formas químicas de acordo com as características físico-químicas do ambiente, podendo estar na forma livre, ionizada ou até mesmo formar complexos com ligantes orgânicos e inorgânicos. Dessa forma, as diferentes espécies de cobre apresentaram biodisponibilidades e, conseqüentemente, toxicidades diferentes.<sup>87</sup>

### **Considerações Finais**

Dentre os 16 compostos apresentados no presente trabalho, o Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine (DCOIT), Clorotalonil, Diclofluanida, Zinco Piritiona, Cobre Piritiona e Óxido Cuproso possuem mecanismos de toxicidade e comportamento ambiental razoavelmente bem compreendidos.<sup>89</sup> Por outro lado, Tiram, Busan (TCMTB), TCMS Piridina e Trifenilbornano Piridina, Ziram, Maneb, Tiocianato de Cobre e Naftenato de Cobre são compostos proporcionalmente menos empregados nas tintas, havendo pouca informação disponível na literatura especializada. Além disso, outros compostos são atualmente relacionados como possíveis candidatos a serem incorporados em sistemas anti-incrustantes, entre eles a “*Econea*” (CAS 122454-29-9), Medetomidina (CAS 106807-72-1) e Capsaicina (CAS 8023-77-6).<sup>89</sup>

## Características ideais de um anti-incrustante

Na busca pelo anti-incrustante de alto desempenho, a indústria naval tem procurado equilibrar a eficiência e a durabilidade dos novos produtos com níveis de toxicidade ambientalmente toleráveis. Com foco nesse objetivo, Takahashi<sup>52</sup> argumenta que os compostos de ação anti-incrustante ideal devem apresentar as seguintes características: (1) amplo espectro de ação, a fim de prevenir com eficiência o estabelecimento das várias espécies de organismos que iniciam a formação do biofilme incrustante; (2) baixa toxicidade para mamíferos; (3) baixa solubilidade em água; (4) baixo potencial de bioacumulação e biomagnificação; (5) baixa ou nenhuma persistência ambiental; (6) compatíveis com os equipamentos e técnicas de pintura atualmente em uso e (7) custos e durabilidade competitivos com os produtos atualmente disponíveis no mercado. Nesse aspecto, a prospecção de compostos pouco persistentes, com baixa toxicidade ambiental e que incorporem revestimentos eficientes e de alta durabilidade é uma tarefa difícil devido às características conflitantes requeridas por um anti-incrustante considerado ideal.<sup>29</sup> Entretanto, entre os biocidas utilizados em tintas de terceira geração despontam alguns candidatos em potencial, visto que, alguns destes atendem razoavelmente as exigências, principalmente se comparados aos compostos utilizados em tintas de segunda geração (como o TBT e o TPT). Dentre os compostos que melhor atendem tais exigências, o DCOIT (componente ativo do Sea-Nine) tem recebido especial atenção em função de sua elevada eficiência combinada com rápida degradação no ambiente.<sup>51</sup>

## Avaliações Ecotoxicológicas

Do ponto de vista ecotoxicológico, a utilização simultânea de diversos produtos com atividade biocida nas tintas de terceira geração, representa uma dificuldade



suplementar à realização de experimentos que simulem condições realísticas. Mesmo assim, estudos do efeito de diferentes combinações de biocidas utilizados nas novas formulações têm sido realizados pela exposição simultânea a organismos-teste. Foram observados, por exemplo, efeitos sinérgicos e aditivos entre combinações de 2 e 3 compostos diferentes.<sup>90</sup> Porém, é muito difícil realizar avaliações precisas na medida que algumas tintas podem conter até 4 diferentes agentes tóxicos na sua composição<sup>14</sup> e que, em uma mesma marina ou porto, trafegam embarcações que utilizam produtos distintos. Soma-se a isso, os demais compostos que constituem as tintas, assim como a interação com inúmeros outros contaminantes já presentes nestes ambientes, o que resulta em uma mistura extremamente complexas de analitos.

Alternativamente, experimentos foram concebidos a fim de realizar exposição de organismos-teste diretamente às tintas anti-incrustantes e não somente aos biocidas nelas presentes. Nesse aspecto, o trabalho realizado por Karlsson *et al.*<sup>91</sup> com a macroalga *Ceramium tenuicorne* e o copépode *Nitocra spinipes* merece especial atenção. Nesse estudo, os autores pintaram placas de plástico de 5 cm<sup>2</sup> com diferentes produtos destinados a embarcações que trafegam no Mar Báltico. Estas placas foram então submersas em água do mar artificial por diferentes períodos, a qual foi posteriormente utilizada como solução teste nos experimentos de exposição. Com essa abordagem, Karlsson e colaboradores desenvolveram uma técnica capaz de avaliar simultaneamente os efeitos tóxicos da complexa matriz que representam as tintas anti-incrustantes. Apesar das limitações iniciais, experimentos que tentam melhor reproduzir a realidade da exposição representam um avanço e são uma alternativa aos que não levam em consideração a interação na exposição simultânea a diversos compostos.

## Determinações analíticas

Estudos sobre toxicidade, ocorrência e comportamento ambiental de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes requerem métodos robustos e, capazes de determinar simultaneamente esses compostos em amostras ambientais. A grande diversidade de propriedades físico-químicas e a profusão de metabólitos de interesse, que podem se formar no ambiente contribui substancialmente para dificultar o desenvolvimento de uma metodologia que atenda estes requisitos. Entretanto, alguns métodos simultâneos de determinação têm sido publicados na literatura especializada. Por exemplo, Thomas<sup>55</sup> descreve um método analítico capaz de determinar simultaneamente Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine, TCMS piridina e TCMTB. Essa técnica utiliza EFS (com cartuchos de C18 e polimérico) e detecção por CL/EM com ionização química a pressão atmosférica. Similarmente, o método proposto por Aguerra *et al.*<sup>54</sup> determina Irgarol 1051, Diuron, Sea-Nine, TCMTB, Clorotalonil e Diclorofluanida, em uma única injeção, por CG/EM.

Entretanto, alguns compostos como as Piritionas metálicas (ZP e CP) e os dtiocarbamatos (Tiram, Ziram e Maneb) apresentam propriedades físico-químicas intrínsecas, as quais dificultam sua análise juntamente com outros compostos. Dessa forma, o desenvolvimento e validação de um método de quantificação multiresíduo para os 16 biocidas homologados para utilização em tintas anti-incrustantes de terceira geração representa ainda um grande desafio analítico.<sup>5</sup>

## Perspectivas Futuras

Em virtude da constante pressão internacional sobre a utilização de tintas anti-incrustantes, a indústria naval tem frequentemente buscado alternativas ambientalmente amigáveis. Entre essas iniciativas destacam-se o desenvolvimento de tintas anti-incrustantes à base de produtos naturais e os revestimentos livres de biocidas.

Muitos organismos produzem naturalmente substâncias com atividade anti-incrustante, a fim de prevenir a colonização dos seus próprios corpos por biofilmes de organismos. Esses produtos naturais pertencem a diferentes grupos químicos como: terpenos, compostos nitrogenados, fenóis, esteroides, dentre outros. Estudos preliminares indicam que algumas dessas substâncias apresentam atividade anti-incrustante tão satisfatória quanto à observada em compostos organoestânicos. Sendo assim, existe uma forte expectativa de se utilizar, no futuro, esses compostos como ingrediente ativo em tintas anti-incrustantes.<sup>92</sup> Nesse contexto, alguns estudos no Brasil tem indicado, que determinadas espécies de macroalgas vermelhas produzem metabólitos com elevada atividade anti-incrustante. Esses metabólitos podem, no futuro, ser utilizados como ingredientes ativos em tintas náuticas.<sup>93</sup>

Outra abordagem que vem sendo testada recentemente é a aplicação de anti-incrustantes livres de biocidas. Esses revestimentos apresentam um mecanismo de ação totalmente diferente das tintas anti-incrustantes tradicionais. Eles atuam essencialmente por meio da formação de uma barreira extremamente lisa, que dificulta a aderência de organismos aquáticos, favorecendo sua remoção natural durante o deslocamento da embarcação. Constituídos principalmente de polímeros de flúor (teflon) e silicones, os revestimentos livres de biocidas tem se mostrado eficientes para embarcações velozes (>21 nós). Entretanto, sua durabilidade é inferior a 3 anos para embarcações mais lentas, o que inviabiliza comercialmente sua aplicação em embarcações de grande porte.<sup>2</sup> Adicionalmente, alguns estudos demonstraram experimentalmente a liberação de compostos indesejáveis, bem como efeitos tóxicos relacionados a esses novos tipos de revestimento.<sup>94</sup>

Recomendações Finais

O desenvolvimento de métodos analíticos robustos, capazes de determinar simultaneamente e com precisão os níveis dos compostos anti-incrustantes de 3ª geração em amostras ambientais é, sem dúvida, uma das grandes necessidades globais relacionadas à avaliação do seu impacto. Concomitantemente ao desenvolvimento dessas metodologias, é fundamental que sejam identificadas as áreas mais suscetíveis a contaminação e viabilizados estudos de monitoramento das áreas mais passíveis a impacto (ex.: importante atividade de navegação e circulação restrita). Esta questão é especialmente delicada em se tratando de regiões como a América do Sul, em razão da quase inexistência de estudos dessa natureza.

Além disso, precisam ser realizadas avaliações ecotoxicológicas mais realísticas, envolvendo, principalmente, a exposição de organismos nativos a misturas de biocidas e/ou às próprias tintas no intuito de se obter avaliações de risco mais condizentes com a realidade e particularidades de cada região. Da mesma forma que estudos ecotoxicológicos devem ser integrados a dados de ocorrência ambiental, a fim de avaliar a possível extensão dos danos causados pela utilização destes produtos. Esta é a melhor forma de subsidiar a implementação de medidas regulatórias ou de gestão, as quais, quando necessário, envolvem ações restritivas e/ou mitigadoras, a exemplo do que já acontece em países Europeus e Asiáticos.<sup>26</sup>

## Referências

1. Yebra, D. M.; Kiil, S.; Dam-Johansen, K.; *Prog. Org. Coat.* **2004**, *50*, 75.
2. Almeida, E.; Diamantino, T. C.; de Sousa, O.; *Prog. Org. Coat.* **2007**, *59*, 2.
3. Kotrikla, A.; *J. Environ. Manag.* **2009**, *90*, S77-S85.
4. Godoi, A. F. L.; Favoreto, R.; Santiago-Silva, M.; *Quím. Nova* **2003**, *26*, 708.
5. Fernandez, M. A.; Pinheiro, F.; *Int. J. Environ. Health* **2007**, *1*, 427.
6. Fent, K.; *Toxicology Letters* **2003**, *140-141*, 353.
7. Alzieu, C.; Heral, M.; Thibaud, Y.; Dardignac, M.; Feuillet, M.; *Rev. Inst. Pêches Maritime* **1982**, *45*, 101.
8. Alzieu, C.; *Sci. Total Environ.* **2000**, *258*, 99.

9. Ketata, I.; Denier, X.; Hamza-Chaffai, A.; Minier, C.; *Comp. Biochem. Physiol. , Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *147*, 261.
10. Sonak, S.; *J. Environ. Manag.* **2009**, *90*, S1-S3.
11. Sonak, S.; Pangam, P.; Giriyan, A.; Hawaldar, K.; *J. Environ. Manag.* **2009**, *90*, S96-S108.
12. Shi, H. H.; Huang, C. J.; Zhu, X. S.; Yu, X. J.; Xie, W. Y.; *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, *304*, 179.
13. IMO. Antifouling Systems. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. 2005. London, International Maritime Organization.
14. Okamura, H.; Mieno, H. Em *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*; Konstantinou, I. K., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006.
15. Albanis, T. A.; Lambropoulou, D. A.; Sakkas, V. A.; Konstantinou, I. K.; *Chemosphere* **2002**, *48*, 475.
16. Mukherjee, A.; Mohan Rao, K. V.; Ramesh, U. S.; *J. Environ. Manag.* **2009**, *90*, S51-S59.
17. Gatidou, G.; Thomaidis, N. S.; Zhou, J. L.; *Environ. Int.* **2007**, *33*, 70.
18. Thomas, K. V.; Langford, K. H. Em *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., Eds.; Springer, Tokyo, 2009.
19. Harino, H.; Arai, T.; Ohji, M.; Nobuyuki, M. Em *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., Eds.; Springer, Tokyo, 2009.
20. Demoliner, A.; Caldas, S. S.; Costa, F. P.; Gonçalves, F. F.; Clementin, R. M.; Milani, M. R.; Primel, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1424.
21. Azevedo, D. d.; Gerchon, E.; Reis, E. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 292.
22. Okamura, H.; Sugiyama, Y.; *Chemosphere* **2004**, *57*, 739.
23. Okamura, H.; Aoyama, I.; Takami, T.; Maruyama, T.; Suzuki, Y.; Matsumoto, M.; Katsuyama, I.; Hamada, J.; Beppu, T.; Tanaka, O.; Maguire, R. J.; Liu, D.; Lau, Y. L.; Pacepavicius, G. J.; *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, *40*, 754.
24. Thomas, K. V.; McHugh, M.; Waldock, M.; *Sci. Total Environ.* **2002**, *293*, 117.
25. Lam, K. H.; Wai, H. Y.; Leung, K. M. Y.; Tsang, V. W. H.; Tang, C. F.; Cheung, R. Y. H.; Lam, m. H. W.; *Chemosphere* **2006**, *64*, 1177.
26. Readman, J. Em *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*; Konstantinou, I. K., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006.
27. Voulvoulis, N. Em *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*; Konstantinou, I. K., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006.
28. Basheer, C.; Tan, K. S.; Lee, H. K.; *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *44*, 697.
29. Harino, H.; Langston, W. J. Em *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., Eds.; Tokyo, 2009.
30. Gardinali, P. R.; Plasencia, M. D.; Maxey, C.; *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, *49*, 1072.
31. Ferrer, I.; Barcelo, D.; *J. Chromatogr. , A* **2001**, *926*, 221.
32. Martinez, K.; Ferrer, I.; Barceló, D.; *J. Chromatogr. , A* **2000**, *879*, 27.
33. Gough, m. A.; Fothergill, J.; Hendrie, J. D.; *Mar. Pollut. Bull.* **1994**, *28*, 613.
34. Bowman, J. C.; Readman, J. W.; Zhou, J. L.; *Mar. Pollut. Bull.* **2003**, *46*, 444.
35. Harino, H.; Yamamoto, Y.; Eguchi, S.; Kawai, S.; Kurokawa, Y.; Arai, T.; Ohji, M.; Okamura, H.; Miyazaki, N.; *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* **2007**, *52*, 179.
36. Dominguez, L. A.; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2010.
37. Hall, L. W.; Giddings, J. M.; Solomon, K. R.; Balcomb, R.; *Crit. Rev. Toxicol.* **1999**, *29*, 367.

38. Sakkas, V. A.; Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A.; *J. Photochem. Photobio. A.* **2002**, *147*, 135.
39. Perina, F. C.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2009.
40. Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N.; *Chemosphere* **1999**, *38*, 3503.
41. Hernando, M.; Mezcuca, M.; Barcelo, D.; Fernandez-Alba, A. R. Em *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*; Konstantinou, I. K., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006.
42. Ferrer, I.; Ballesteros, B.; Marco, M. P.; Barcelo, D.; *Env. Sci. Techol.* **1997**, *31*, 3530.
43. Thomas, K. V.; Blake, S. J.; Waldock, M. J.; *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, *40*, 739.
44. Lamoree, M. H.; Swart, C. P.; van der Horst, A.; van Hattum, B.; *J. Chromatogr. , A* **2002**, *970*, 183.
45. Thomas, K. V.; Fileman, T. W.; Readman, J. W.; Waldock, M. J.; *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, *42*, 677.
46. Konstantinou, I. K.; Albanis, T. A.; *Environ. Int.* **2004**, *30*, 235.
47. Mochida, K.; Fujii, K. Em *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., Eds.; Springer, Tokyo, 2009.
48. Manzo, S.; Buono, S.; Cremisini, C.; *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* **2006**, *51*, 61.
49. Harino, H.; Yamamoto, Y.; Eguchi, S.; Kawai, S.; Kurokawa, Y.; Arai, T.; Ohji, M.; Okamura, H.; Miyazaki, N.; *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* **2007**, *52*, 179.
50. Gerecke, A. C.; Tixier, C.; Bartels, T.; Schwarzenbach, R. P.; Muller, S. R.; *J. Chromatogr. , A* **2001**, *930*, 9.
51. Jacobson, A. H.; Willingham, G. L.; *Sci. Total Environ.* **2000**, *258*, 103.
52. Takahashi, K. Em *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., Eds.; Springer, Tokyo, 2009.
53. Sakkas, V. A.; Konstantinou, I. K.; Albanis, T. A. Em *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*; Konstantinou, I. K., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006, Chapter 8.
54. Aguera, A.; Piedra, L.; Hernando, M. D.; Fernandez-Alba, A. R.; *J. Chromatogr. , A* **2000**, *889*, 261.
55. Thomas, K. V.; *J. Chromatogr. , A* **1998**, *825*, 29.
56. Walker, W. W.; Cripe, C. R.; Pritchard, P. H.; Bourquin, A. W.; *Chemosphere* **1988**, *17*, 2255.
57. Walker, A.; Jurado-Exposito, M.; *Weed Res.* **1998**, *38*, 229.
58. Carbery, K.; Owen, R.; Frickers, T.; Otero, E.; Readman, J.; *Mar. Pollut. Bull.* **2006**, *52*, 635.
59. Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N.; *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, *40*, 938.
60. van Wezel, A. P.; van Vlaardingen, P.; *Aquat. Toxicol.* **2004**, *66*, 427.
61. Caux, P. Y.; Kent, R. A.; Fan, G. T.; Stephenson, G. L.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **1996**, *26*, 45.
62. Hamwijk, C.; Schouten, A.; Foekema, E. M.; Ravensberg, J. C.; Collombon, M. T.; Schmidt, K.; Kugler, M.; *Chemosphere* **2005**, *60*, 1316.
63. Sakkas, V. A.; Konstantinou, I. K.; Albanis, T. A.; *J. Chromatogr. , A* **2001**, *930*, 135.
64. Bellas, J.; *Sci. Total Environ.* **2006**, *367*, 573.
65. Fernandez-Alba, A. R.; Hernando, M. D.; Piedra, L.; Chisti, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *456*, 303.
66. Cereser, C.; Boget, S.; Parvaz, P.; Revol, A.; *Toxicology* **2001**, *162*, 89.

67. Samanidou, V.; Fytianos, K.; Pfister, G.; Bahadir, M.; *Sci. Total Environ.* **1988**, *76*, 85.
68. Van Leeuwen, C. J.; Maas-Diepeveen, J. L.; Niebeek, G.; Vergouw, W. H. A.; Griffioen, P. S.; Luijken, M. W.; *Aquat. Toxicol.* **1985**, *7*, 145.
69. Van Leeuwen, C. J.; Moberths, F.; Niebeek, G.; *Aquat. Toxicol.* **1985**, *7*, 165.
70. Van Leeuwen, C. J.; Helder, T.; Seinen, W.; *Aquat. Toxicol.* **1986**, *9*, 147.
71. Van Leeuwen, C. J.; Espeldoorn, A.; Mol, F.; *Aquat. Toxicol.* **1986**, *9*, 129.
72. Crnogorac, G.; Schwack, W.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 40.
73. Kawamoto, T.; Yano, M.; Makihata, N.; *J. Chromatogr. , A* **2005**, *1074*, 155.
74. Bragadin, M.; Iero, A.; Cima, F.; Ballarin, L.; Manente, S.; *Toxicol. in Vitro* **2007**, *21*, 1127.
75. Harino, H.; *Coastal marine science* **2004**, *29*, 28.
76. Okamura, H.; Kitano, S.; Toyota, S.; Harino, H.; Thomas, K. V.; *Chemosphere* **2009**, *74*, 1275.
77. Zhou, X.; Okamura, H.; Nagata, S.; *Chemosphere* **2007**, *67*, 1904.
78. Doose, C. A.; Szalaniec, M.; Behrend, P.; Muller, A.; Jastorff, B.; *J. Chromatogr. , A* **2004**, *1052*, 103.
79. Maraldo, K.; Dahllof, I.; *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, *48*, 894.
80. Harino, H.; Ohji, M.; Wattayakorn, G.; Arai, T.; Rungsupha, S.; Miyazaki, N.; *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* **2006**, *51*, 400.
81. Karlsson, J.; Eklund, B.; *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, *49*, 456.
82. Harino, H.; Midorikawa, S.; Arai, T.; Ohji, M.; Cu, N. D.; Miyazaki, N.; *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **2006**, *86*, 1163.
83. Agarwal, S.; Aggarwal, S. G.; Singh, P.; *Talanta* **2005**, *65*, 104.
84. Moriwaki, H.; Yukihiko Yamaguchi; Minoru Fukushima; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2374.
85. Thiruchelvam, M. Em *Encyclopedia of Toxicology*; Philip, W., Ed.; Elsevier, New York, 2005.
86. Voulvoulis, N.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N.; *Chemosphere* **1999**, *38*, 3503.
87. Brooks, S. J.; Waldock, M. Em *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*; Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., Eds.; Springer, Tokyo, 2009.
88. Jones, B.; Bolam, T.; *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, *54*, 1127.
89. Thomas, K. V.; Brooks, S.; *Biofouling* **2010**, *26*, 73.
90. Koutsaftis, A.; Aoyama, I.; *Sci. Total Environ.* **2007**, *387*, 166.
91. Karlsson, J.; Breitholtz, M.; Eklund, B.; *Mar. Pollut. Bull.* **2006**, *52*, 1661.
92. Omae, I. Em *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*; Konstantinou, I. K., Ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006.
93. da Gama, B. A. P.; Carvalho, A. G. V.; Weidner, K.; Soares, A. R.; Coutinho, R.; Fleury, B. G.; Teixeira, V. L.; Pereira, R. C.; *Botanica Marina* **2008**, *51*, 191.
94. Watermann, B. T.; Daehne, B.; Sievers, S.; Dannenberg, R.; Overbeke, J. C.; Klijnstra, J. W.; Heemken, O.; *Chemosphere* **2005**, *60*, 1530.
95. Lambropoulou, D. A.; Sakkas, V. A.; Albanis, T. A.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, *84*, 47.

## **CAPÍTULO II – Avaliação Preliminar**

Esse capítulo objetivou avaliar preliminarmente a ocorrência de imposex na espécie *Stramonita haemastoma* nos principais terminais portuários da região Sul do Brasil, tendo sido o ponto de partida para o desenvolvimento desta tese ao comprovar a ocorrência do problema em áreas navegadas da região Sul do país. O artigo intitulado “Preliminary appraisal of imposex in areas under the influence of southern Brazilian harbors” está publicado na revista “Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology”



## **Preliminary appraisal of imposex in areas under the influence of Southern Brazilian harbors**

Italo Braga Castro<sup>1,2</sup>; Carlos Emílio Bemvenuti<sup>2</sup> & Gilberto Fillmann<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Zoobentos, Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR/UFC

<sup>2</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, C.P. 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

### **Abstract**

Imposex in gastropod mollusks is an efficient and low-cost biomarker for pollution by organotin compounds. Such substances are typically found in areas with an intense flux of vessels, such as marinas and harbors. This study preliminarily evaluated the occurrence of imposex in *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1758) populations along the areas under the influence of the main harbors from southern Brazil (Paranaguá, PR; São Francisco do Sul, SC; Itajaí, SC; and Rio Grande, RS). Although no chemical analyses were performed so far to confirm the presence of organotins, the occurrence of imposex strongly suggests a contamination by these compounds in the studied areas and it is likely that the closest from the harbors (as the main sources) the more contaminated the environment. However, due to the limitations of *S. haemastoma*, it is important to assess the response of alternative species adapted to mesohaline environments and non-consolidated substrates, in order to make up for the lack of indicator species for some areas such as Patos Lagoon and Itajaí-Açu estuaries.

**Key words:** imposex, *Stramonita haemastoma*, organotin, estuary, southern Brazil.

### **Resumo**

O imposex em moluscos gastrópodes é um eficiente biomarcador de baixo custo para contaminação por compostos orgânicos de estanho. Esses compostos são tipicamente encontrados em áreas com intenso fluxo de embarcações tais como marinas e terminais portuários. O presente estudo verificou preliminarmente a ocorrência de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* ao longo das áreas sob a influência dos principais terminais portuários do sul do Brasil (Paranaguá (PR), São Francisco do Sul (SC), Itajaí (SC) e Rio Grande (RS)). Apesar de não confirmados quimicamente, a ocorrência de imposex em todas as áreas estudadas sugere uma contaminação por compostos orgânicos de estanho, sendo possivelmente tanto maior quanto mais próxima dos portos (ou das fontes). Porém, em razão das limitações de *S. haemastoma*, é importante avaliar esta resposta em espécies alternativas que suportem ambientes mesohalinos e com substratos não consolidados, possibilitando assim uma avaliação mais completa de ambientes como os estuários da Lagoa dos Patos e Itajaí-Açu.

**Palavras chave:** Imposex, *Stramonita haemastoma*, organoestanho, estuário, sul do Brasil

## Introduction

Imposex is the appearance of male sexual features (penis and vas deferens) in neogastropod females exposed to organotin compounds (tributyltin and triphenyltin) (Gibbs & Bryan, 1987). This is a highly specific biomarker, which indicates a physiological changes associated with the reproductive organs in gastropods exposed to organotin compounds (Matthiessen & Gibbs, 1998). Such compounds are found mainly in antifouling paints used for the coating of ships and aquaculture structures (Horigushi *et al.*, 1994). Therefore, it has been widely used worldwide to monitor the contamination of aquatic environments (Morcillo & Porte, 1998; Axiak, *et al.*, 2003; Minchin, 2003), being reported in 132 species of gastropod mollusks (Castro *et al.*, *in press*).

Some cases of imposex were reported in Latin America, specifically in Chile using *Nucella crassilabrum*, *Chorus giganteus*, *Xantochorus cassidiformes* (Gooding *et al.*, 1999) and *Acanthina monodon* (Osorio & Huaquin, 2003), and in Argentina using *Bucinanops monilifer*, *Adelamelon brasiliana* (Penchaszadeh *et al.*, 2001) and *Ollivancilaria auritularia* (Cledon *et al.*, 2006) as bioindicators. Imposex was also found at Northeast and Southeast coast of Brazil during monitoring studies using the muricid *Stramonita haemastoma* at Ceará (Castro *et al.*, 2000), Paraíba, Pernambuco (Castro, 2005) and Rio de Janeiro (Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez, *et al.*, 2005), and *Stramonita rustica* at Rio Grande do Norte (Castro *et al.*, 2004), Alagoas (Camillo *et al.*, 2004) and Sergipe (Castro *et al.*, 2005). Caetano & Absalão (2003) also found imposex in the olivid *Ollivancilaria vesica* at coastal areas of Rio de Janeiro. All of these studies showed a clear relationship with the distance from harbors.

Considering the lack of previous studies, this work aims to preliminarily verify the occurrence of imposex in areas under the influence of the most important harbors of

Southern Brazil (e.g. Paranaguá-PR, São Francisco do Sul-SC, Itajaí-SC and Rio Grande-RS) using *Stramonita haemastoma* as a bioindicator.

## Materials And Methods

Four harbors in the southern region of Brazil were chosen based on their cargo load and annual flow of vessels. Up to five sampling stations were chosen for the region under the influence of each harbor based on the distance from potential sources of contamination, availability of *Stramonita haemastoma* and local dynamics (Table 1).

Table 1. Position (latitude and longitude) of the sampling stations and their distance from the main harbor.

Harbor	Site	Description	Latitude	Longitude	Distance from harbor (km)	N <sup>o</sup> ships /year *
Paranaguá (Paranaguá Bay)	E1	Galheta Island	26°55'11"	48°38'28"	23.93	2252
	E2	Mel Island	25°34'24"	48°19'01"	23.53	
	E3	Marina	25°32'41"	48°22'31"	17.00	
	E4	Guara Island	25°28'45"	48°31'36"	2.87	
	E5	Gererê Island	25°29'02"	48°34'31"	4.22	
São Francisco do Sul (Babitonga Bay)	E1	Paulas Beach	26°13'39"	48°36'59"	2.28	395
	E2	Ingleses Beach	26°13'45"	48°37'39"	1.32	
	E3	Northeastern Harbor	26°13'53"	48°38'6,7"	0.66	
	E4	Tourist Harbor	26°14'30"	48°38'24"	0.45	
	E5	Flores Island	28°15'54"	48°42'31"	6.19	
Itajaí (Itajaí-Açu estuary)	E1	Brava Beach	26°55'43"	48°37'39"	5.37	902
	E2	Cabeçudas Beach	26°55'17"	48°38'12"	3.52	
	E3	Outside of South Jetty	26°54'56"	48°28'23"	2.99	
	E4	Outside of North Jetty	26°54'37"	48°34'30"	2.57	
Rio Grande (Patos Lagoon estuary)	E1	Ship Wreck	32°17'29"	52°15'34"	19.32	1652
	E2	Outside base of West Jetty	32°09'39"	52°05'49"	1.42	
	E3	Outside end of West Jetty	32°11'00"	52°05'00"	5.24	
	E4	Outside end of East Jetty	32°08'50"	52°04'40"	5.62	
	E5	Outside base of East Jetty	32°10'56"	52°04'30"	2.48	

\* Source: Ministério dos Transportes, 2006

Up to 30 adult specimens (20-30 mm) of *S. haemastoma* were sampled (either manually or by free diving) in each station during January 2006. The organisms were stored in plastic bags, labeled and taken to the laboratory where they were narcotized with a 3.5% MgCl solution for a period of 2 hours. Shells were then measured with a caliper (0.05mm) from the spiral tip to the end of the siphon channel. Thus, shells were removed for the analysis of the soft tissues. Gender identification was based on the presence of a seminal receptacle (only in females) and the prostate gland (only in males).

The imposex levels were quantified using the following indexes: % of imposex in females, Relative Penis Length Index (RPLI) and the Vas Deferens Development Stage Index (VDSI). The RPLI was calculated by mean penis length in females / mean penis length in males) x 100 (Gibbs & Bryan, 1987), while the VDSI comprised the six-stage scale proposed by Gibbs & Bryan (1994) for *Nucella lapillus* and modified by Fernandez et al. (2005) for organisms of *Stramonita* genus.

## **Results**

**Paranaguá Bay (PR).** Most of the stations sampled at Paranaguá Bay showed an imposex occurrence higher than 85%, with the highest levels found in stations E4 (located in front of the Paranaguá harbor) and E3 (located nearby a big marina where many small boats were moored). Station E1 showed the lowest levels, since it was located in the outer part of the bay and far away from possible sources (Figure 1).

**Babitonga Bay (SC).** The levels found in the inner part of the Bay showed an imposex gradient decreasing with increasing distance from the São Francisco do Sul harbor. Stations E4 (north to the harbor) and E3, E2 and E1 (south from it) showed imposex in 100% of the sampled organisms with an RPLI as high as 65.0. On the other

hand, the organisms from station E5 did not show any sign of imposex, due to probably its upstream location (Figure 2).

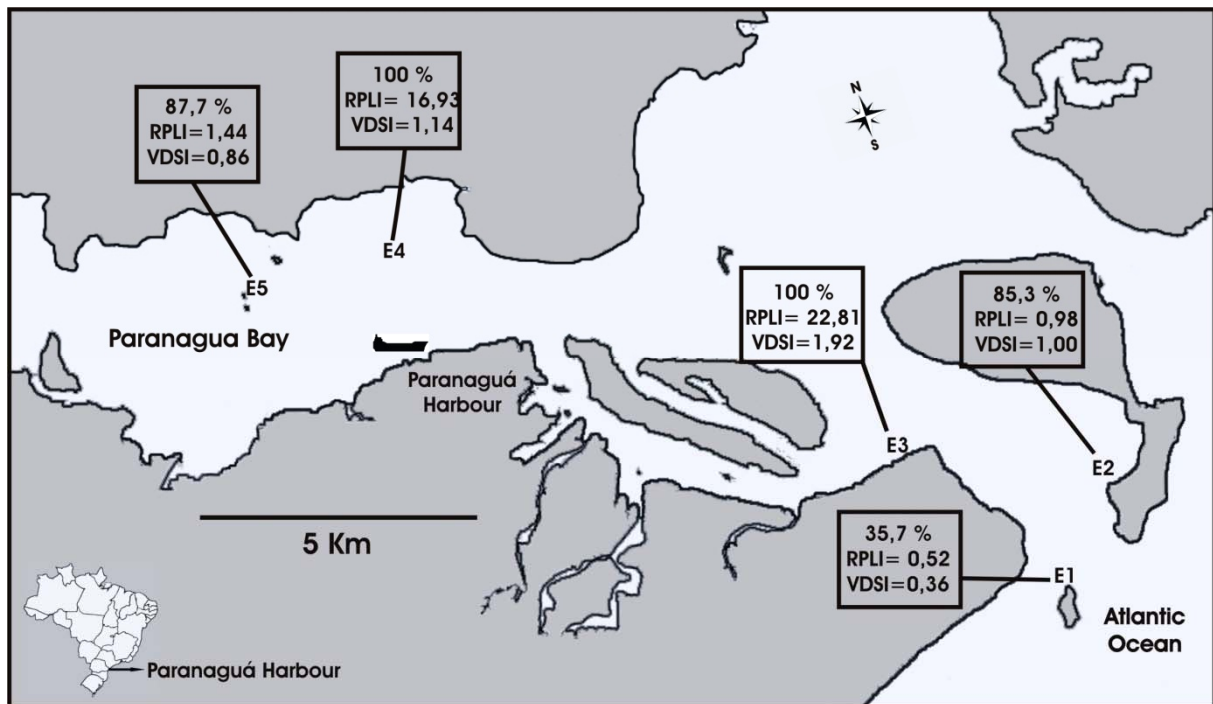


Figure 1. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled at Paranaguá Bay (PR).

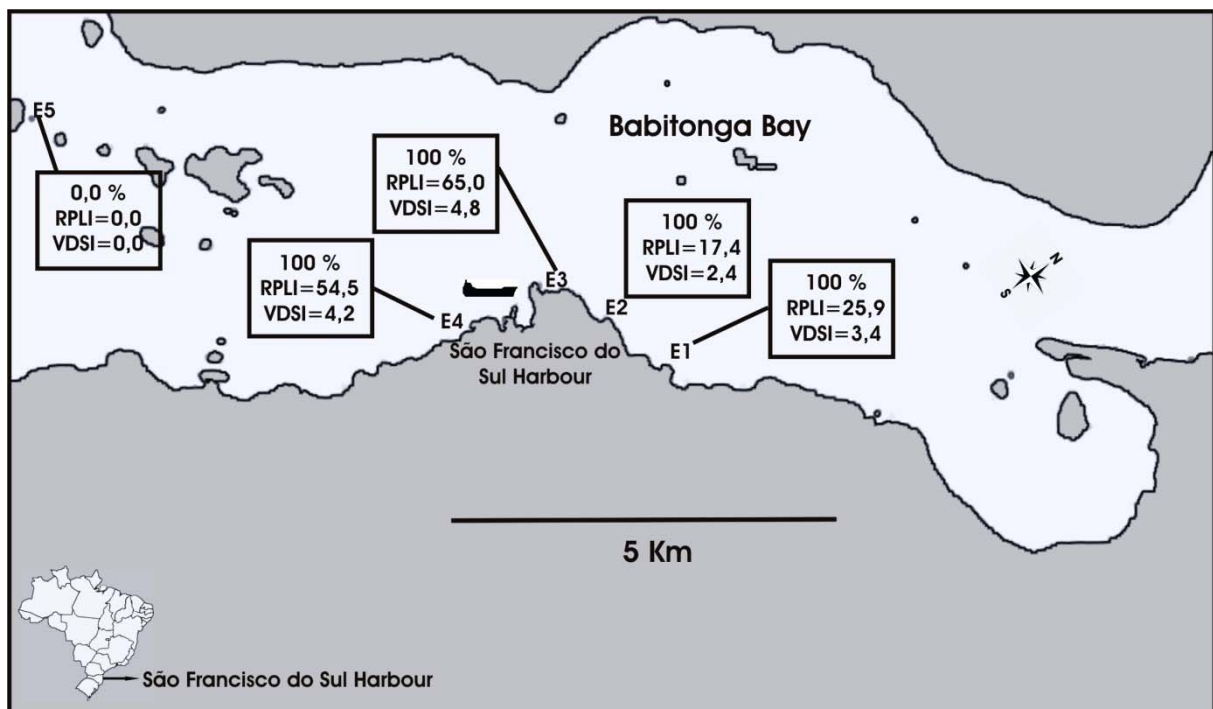


Figure 2. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled at Babitonga Bay (SC).

**Itajaí-Açu estuary and adjacent coastal area (SC).** Two out of four sampled stations under the influence of the Itajaí Harbor showed imposex. Stations E3 and E4, both located at the jetties protecting the harbor's access channel, showed imposex in 100% of the sampled organisms with an RPLI of 3.8 and 1.8, respectively (Figure 3). Stations E2 and E1 did not show any sign of imposex, possibly because of their location at the adjacent coast and far away from the harbor.

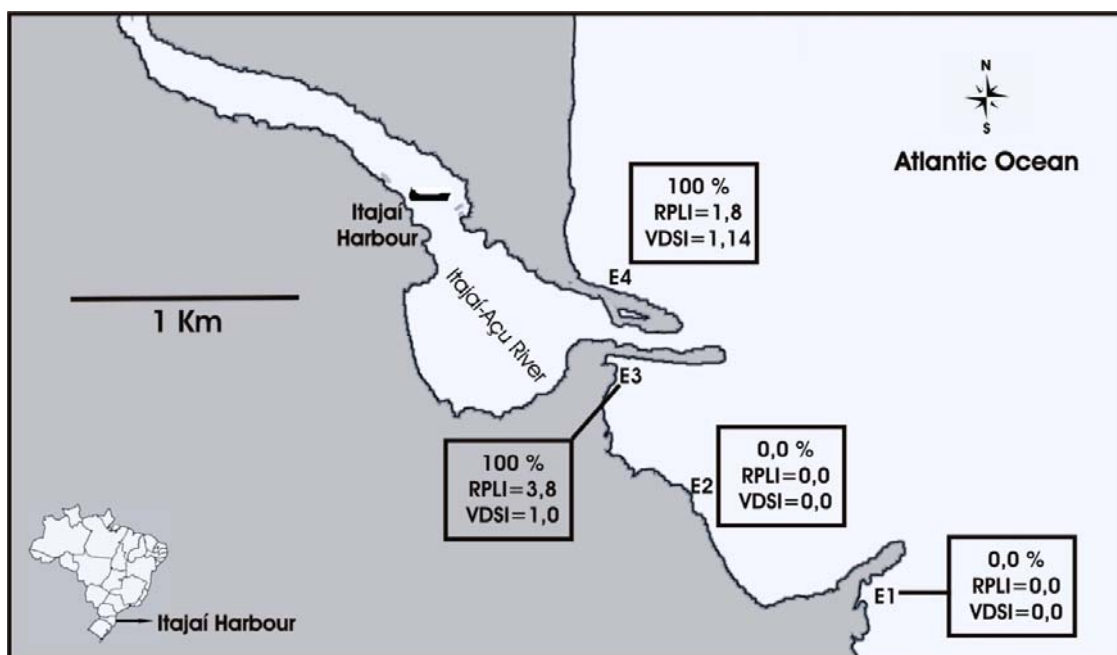


Figure 3. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled nearby the Itajaí harbor and adjacent coastal area.

**Patos Lagoon estuary and adjacent coastal area (RS).** Imposed animals were found in every sampling station, with the highest indexes found at stations located at the jetty protecting the west side of the access to the Rio Grande harbor (e.g. E2 and E3) (Figure 4). Even located far away from the harbor and southwards along the coast, station E1 showed imposex in 18% of the sampled organisms (Figure 4).

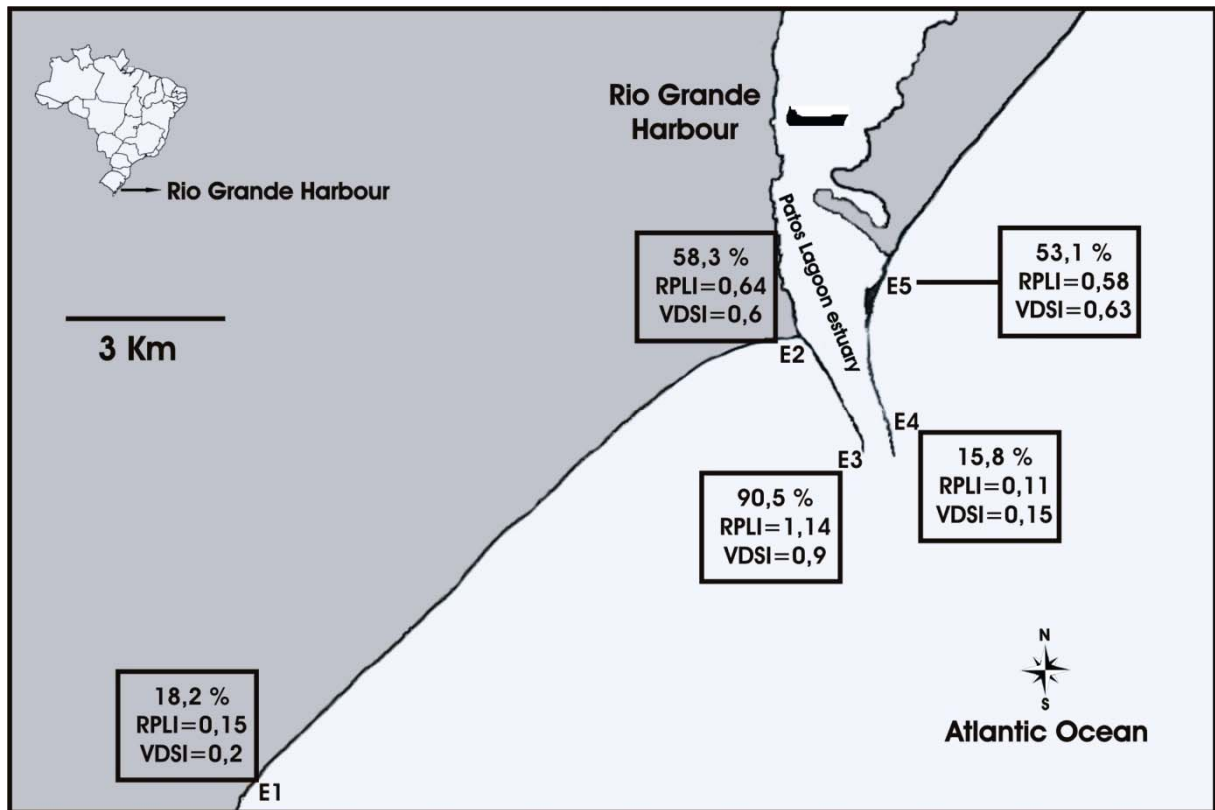


Figure 4. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled nearby the Rio Grande harbor and adjacent coastal area.

## Discussion

*Stramonita haemastoma* was chosen for this study because 38 out of 132 species reported as presenting imposex were from the Thaididae family, and 18 belonged to the genus *Stramonita* (Castro *et al.*, *in press*). This fact makes this family and this genus as well, most commonly taxon used as a bioindicator of contamination by organotin compounds all over the world. Furthermore, *Stramonita haemastoma* presents a wide geographical distribution, being found in consolidated substrates in the intertidal zone practically all along the Brazilian coastline (Matthews, 1968). Additionally, no evidences of natural occurrence of imposex in muricid mollusks (such as *Stramonita haemastoma*) were found so far. Sixteen out of nineteen stations sampled at harbors of southern Brazil showed imposex in *S. haemastoma*. Even showing one of the lowest vessel movements (mean of 352 vessels/year; Table 1), the highest indexes of imposex were found in

Babitonga Bay, on station under the influence of São Francisco do Sul harbor. That is probably due to a reduced water exchange rate, which increases the time of exposure to the contaminants. An imposex gradient was observed as a function of distance from the harbor. Similar patterns are often seen in monitoring surveys at open sea (Castro *et al.*, 2000).

Conversely, the Patos Lagoon estuary showed the lowest imposex indexes, even under the influence of one of the biggest Brazilian harbors (Ministério dos Transportes, 2006). Although the local dynamics and dilution capacity of each region were not taken in consideration, the Patos Lagoon estuary has probably one of the highest water exchange rates (Garcia, 1997) among the studied systems. The difficulty to find *S. haemastoma* individuals in areas under the direct influence of Rio Grande harbor has also some influence since the system has a highest capacity to dilute any substance released into its waters. *S. haemastoma* was found only at the outer faces of the jetties, since the inner ones and the estuary itself very often presents very low salinity, which are not tolerated by this mollusk.

The highest imposex indexes of Paranaguá Bay were found at the station closer to the harbor (station E4) and to a marina (station E3), where an intense flow of recreational boats was observed. However, based on its highest movement of vessels (a mean of 2252 vessels/year; Table 1) and intense flux of recreational boats, Paranaguá Bay should have shown higher imposex levels, which could also be explained by a high capacity to dilute the contaminants. Although most studies on organotin contamination deal mainly with big harbors, it is important to consider the pollution caused by the marinas, where only small and medium-sized boats are found. Studies carried out in marinas of Phuket Island (Thailand) showed imposex levels as high as those found in big harbors around the globe (Bech, 2002).



The Itajaí harbor has a mean annual flow of 902 vessels, mostly constituted by recreational and fishing boats (Ministério dos Transportes, 2006). The results showed the influence of coastal currents on stations located southwards from the entrance of the estuary. Stations E1 and E2 shown no imposex, while stations located at the jetties (E3 and E4) showed the highest indexes of imposex due probably to the permeability of the jetty to the waters coming from the inner estuary. A similar pattern also occurs at the Natal harbor (Northern Brazil) (Castro *et al.*, 2004). However, more detailed studies are needed to confirm this hypothesis. The results indicated a pattern in the distribution of imposex, once indexes degreased with the distance from some of the monitored harbors (or possible sources). Similar results were observed in studies carried out in the Mediterranean with *Hexaplex trunculus* (Axiak *et al.*, 1995), in the Sanriku region in Japan with *Thais clavigera* (Horiguchi *et al.*, 1998), in Crok Harbour, Ireland, with *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin *et al.*, 1996), in Phuket Island, Thailand, with *Chicoreus capucinus* and *Thais distinguenda* (Bech, 2002), in Killybegs, Ireland, with *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin *et al.*, 1997), as well as in many harbors in the Brazilian northeast (Castro *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005).

The use of OTCs is a matter of controversy in the international scientific community. In 1996, the United Nations Marine Environment Protection Committee (MEPC) suggested a gradual elimination of TBT-based paints during the following 10 years. This proposal was exhaustively discussed by several countries, and its prohibition was postponed to 2008 (ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 2003). Some countries (such as Japan, New Zealand and France) have already banned the use of these compounds in their territories. Other countries such as Canada, USA, South Africa, Australia and most of the European Union countries have limited the use of OTCs to vessels longer than 25 meters (Champ, 2000). In a general way, these prohibitions were motivated by the proved toxicity of OTCs

to the biota (ten Hallers-Tjabbes, 1997). On January 1st, 2005 came into effect a new Brazilian resolution for water quality standards (CONAMA 357, 2005).

For the first time levels were established for tributyltin (TBT), with maximum allowed concentrations of 0.01 and 0.37  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Class 1 and 2 salty waters, respectively. Although this regulation represents an improvement, ecotoxicological studies using native species are needed in order to establish more realistic limits, once impacts on marine populations have been reported for exposure to concentrations as low as 0.001  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Alzieu, 2000), which are much lower than those set by the above-mentioned regulation. The results obtained in the present study indicate that every single Southern Brazilian harbor is probably already contaminated by OTCs and possibly the closest from the harbors (as the main sources) the more contaminated the environment.

Although no chemical analyses were performed so far to confirm the presence of organotins, the occurrence of imposex strongly suggests a contamination by these compounds in the studied areas (Matthiessen & Gibbs, 1998). Thus, this screening data will help focusing more detailed future studies, where the unconditional confirmation of contamination will be achieved with the chemical analyses.

In some areas, such as Patos Lagoon estuary and Itajaí-Açu River, imposex indexes were not as high as expected, due probably to the lack of *Stramonita haemastoma* populations in the low salinity regions close to those harbors. Other limitation is that *S. haemastoma* survives only on consolidated substrates such as jetties, rocky shores and harbor columns. Therefore, it is important to assess the response of alternative species, adapted to mesohaline environments and non-consolidated substrates, in order to make up for the lack of indicator species for those areas. In addition, the hydrodynamics must be considered to the better understanding of OTCs distribution along the environment.

Finally, in view of the fact that the continuous worldwide banishment of the organotin-based antifouling paints is likely to reduce their environmental relevance, the present study represents very important baseline information that can be used in the future to evaluate the effectiveness of the total ban.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Center of Marine Studies of the Federal University of Paraná (CEM/UFPR), and especially the members of the Benthos Laboratory: Cynthia Simone Gomes dos Santos, Igor Pessoa and André Senna Garafoni. G. Fillmann was sponsored by CNPQ (PQ 303218/2003-7).

### **References**

- ALZIEU, C. ,2000, Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci Total Environ.*, 258: 99-102.
- AXIAK, V., VELLA, A.J., MICALLEF, D., CHIRCOP, P. & MINTOFF, B., 1995, Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar. Biol.*, 121: 685-691.
- AXIAK, V., MICALLEF, D., MUSCA, T.J., VELLA, A.J. & MINTOFF, B., 2003. Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environ. Int.*, 28: 743-749.
- BECH, M., 2002 Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ. Pollut.*, 117: 421-429.
- CAETANO, C.H.S. & ABSALÃO, R.S., 2003, Imposex in *Olivancillaria vesica vesica* (Gmelin) (Gastropoda, Olividae) from a Southeastern Brazilian sandy beach. *Rev. Bras. Zool.*, 19: 215-218.
- CAMILLO, E., QUADROS, J., CASTRO, I.B. & FERNANDEZ, M.A.S., 2004, Imposex in *Thais rustica* (Mollusca:Neogastropoda) (Lamarck, 1822) as an indicator of organotin compounds pollution at Maceio coast (Northeastern Brazil). *Braz. J. Ocean.*, 52: 101-105.
- CASTRO, I.B., MATTHEWS-CASCON, H. & FERNANDEZ, M.A.S., 2000, Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da

contaminação por organoestânicos na costa do município de Fortaleza. *Arq. Ciên. Mar*, 33: 51-56.

CASTRO, I.B., MEIRELLES, C.A.O., MATTHEWS-CASCON, H. & FERNANDEZ, M.A.S., 2004, *Thais (Stramonita) rustica* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Thaididae), a potential bioindicator of contamination by organotin in Northeast Brazil. *Braz. J. Ocean.*, 52: 135-139.

CASTRO, I.B., 2005, Estudo do Imposex em Muricídeos do gênero *Stramonita* (Mollusca: Gastropoda) no Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências do Mar. 187pp.

CASTRO, I.B., CAVALCANTE-BRAGA, A.R. & ROCHA-BARREIRA, C.A., 2005, Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) em áreas portuárias dos estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. *Trop.Ocean.*, 33: 121-128.

CASTRO, I.B., MEIRELLES, C.A.O., PINHEIRO, J.C.L., MATTHEWS-CASCON, H. & ROCHA-BARREIRA, C.A., 2005, The increasing incidence of imposex in *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) after the establishment of the Pecem Harbor, Ceara state, Northeast Brazil. *Thalassas*, 21: 71-75.

CASTRO, I. B., RODRIGUES, L., ROCHA-BARREIRA, C.A., 2007, Compostos Orgânicos de Estanho: Efeitos sobre a fauna marinha – Uma Revisão. *Arq. Cien. Mar*, in press.

CHAMP, M.A., 2000, A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.*, 258: 21-71.

CLEDON, M., THEOBALD, N., GERWINSKY, W. & PENCHASZADEH, P.E., 2006, Imposex and organotin compounds in marine gastropods and sediments from the Mar del Plata coast, Argentina *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 86: 1-5.

CONAMA 357, 2005. National Council of Environment (CONAMA). Resolution N° 357, March 17<sup>th</sup>, 2005. Ministry of Environment (MMA). Government of Brazil. 23 p.

FERNANDEZ, M.A.S., LIMAVERDE, A.C., CASTRO, I.B., WAGENER, A.L.R. & ALMEIDA, A.C.O., 2002, Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Rep. Public Health*, 18: 463-476.

FERNANDEZ, M.A.S., WAGENER A.L.R., LIMAVERDE, A.C., SCOFIELD, A.L., PINHEIRO, F.M. & RODRIGUES, E., 2005, Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.*, 59: 435-452.

GIBBS, P.E. & BRYAN, G.M., 1987, TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 68: 1482-1487.

GIBBS, P.E. & BRYAN, G.M., 1994, Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod mollusks. In: *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. Kees, J.M. Kramer ed., CRC Press Inc. Boca Ratón, EUA, p. 2005-226.

GOODING, M., GALLARDO, C. & LEBALANC, G., 1999, Imposex in three marine Gastropod species in Chile and potential impact on Muriciculture. *Mar. Poll. Bull.*, 38: 1227-1231.

HORIGUCHI, T., SHIRAIISHI, H., SHIRAIISHI, H. & MORITA, M., 1994, Imposex and Organotin Compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 74: 651-669.

HORIGUCHI, T., HYEON-SEO, C., SHIRAIISHI, H., SHIBATA, Y., SOMA, M., MORITA, M. & SHIMIZU, M., 1998, Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci. Total Environ.*, 214: 65-70.

MATTHEWS, H.R., 1968, Notas sobre o gênero *Thais* Roding, 1798 no Nordeste Brasileiro. *Arq. Est. Biol. Mar*, 8: 37-41.

MATTHIESSEN, P. & GIBBS, P.E., 1998, Critical appraisal of the evidence for Tributyltin - mediated endocrine disruption in Mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 37-43.

MINCHIN, D., STROBEN, E., OEHLMANN, J., BAUER, B., DUGGAN, C.B. & KEATINGE, M., 1996, Biological Indicators Used to Map Organotin Contamination in Cork Harbour, Ireland. *Mar. Pollut. Bull.*, 32: 188-195.

MINCHIN, D., BAUER, B., OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U. & DUGGAN, C.B., 1997, Biological indicators used to map organotin contamination from a fishing port, Killybegs, Ireland. *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 235-243.

MINCHIN, D., 2003, Monitoring of tributyltin contamination in six marine inlets using biological indicators. *Mar. Environ. Health.*, 6: 1-15.

MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES, <http://www.transportes.gov.br/>, accessed in October 6<sup>th</sup> 2006.

MORCILLO, Y. & PORTE, C., 1998, Monitoring of organotin compounds and their effects in marine mollusks. *TRAC*, 17: 109-116.

OSÓRIO, C. & HUAQUIN, L.G., 2003, Alteración de la sexualidad de *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) em la litoral de Chile central, inducida por compuestos organoestañosos. *Cienc. Tecnol. Mar.*, 26: 97-107.

PENCHASZADEH, P.E., AVERBUJ, A. & CLEDÓN, M., 2001, Imposex in gastropods from Argentina (southwestern Atlantic) *Nucella lapillus* and the common whelk *Buccinum undatum* as indicators of TBT contamination. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 790-791.

TEN HALLERS-TJABBES, C.C., 1997, Tributyltin and Policies for antifouling. *Environ. Technol.*, 18: 1265-1268.

TEN HALLERS-TJABBES, C.C., WAGERNER, J., HATTUM, B.V., KEMP, J.F., TEM HALLERS, E., REITSEMA, T.J. & BOON, J.P., 2003, Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. *Mar. Environ. Res.*, 55: 203-233.

### **CAPÍTULO III – Validação de Métodos**

O presente capítulo apresenta as etapas referentes a otimização e validação de um método analítico necessário à determinação de compostos orgânicos de estanho em matrizes ambientais (sedimento e biota). Esse capítulo será apresentado sob a forma de um artigo científico intitulado “*Effect of environmental matrices in butyltin determinations by GC/MS*”, o qual será submetido ao periódico “*Journal of Hazardous Materials*”.

## Effect of environmental matrices in butyltin determinations by GC/MS

Ítalo Braga Castro<sup>1</sup>, Patrícia Gomes Costa<sup>1</sup>, Ednei Gilberto Primel<sup>2</sup> & Gilberto Fillmann<sup>1\*</sup>

1- Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO). Rio Grande – RS – Brazil 96201-900 \*Corresponding author: italobraga@gmail.com

2- Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Análises de Contaminantes Orgânicos e Metais (LACOM). Rio Grande – RS – Brazil 96201-900

### Abstract

Tributyltin was used as active biocide in antifouling paints for three decades, due its high environmental toxicity, the use of that compound in marine coatings was banned by International Maritime Organization in 2008. Thereby, in order to monitor the restriction effectiveness in coastal areas, accurate methodologies are needed. Gas chromatography is the most popular technique employed for butyltin compounds determinations in environmental samples, however this analyses are often influenced by matrix effect. The current study evaluated the matrix effect associated to determination of TPrT, TBT, DBT and MBT in sediment and mussel tissues using derivatization by Grignard reaction and quantification by GC-MS. A non-negligible matrix effect was verified for sediments (54.2, 20.3, 13.6 and -53.6) and mussel tissues (-12.5, -32.0, 59.4 and 65.7) for TPrT, TBT, DBT and MBT respectively. However, this effect could be combated to the preparation of the analytical curves using standard addition. Additionally was proposed and validated a method for determining these analytes in environmental samples using standard addition techniques and LLE sample preparation. The analytical method proved to be effective to determinate butyltin compounds in sediments and mussel tissues.

**Key-words:** validation, organotin, sediment, biota, matrix effect



## Introduction

Organotin compounds (OTs), particularly tributyltin (TBT), were used as fluid in transformers and capacitors since 1920s, but its biocides properties were discovered by International Council of Researches on Paints only in 1950s. Thereafter began to be used commercially as fungicides, acaricides and other pesticides. However, the most well-known OTs application was as active agent in antifouling paints during the last four decades [1,2]. Antifouling paints are used in solid surfaces exposed directly to sea water including, hulls of ships, aquaculture nets, off shore structures, and ducts, in order to avoid undesirable accumulation of marine organisms (fouling) [3,4].

The first TBT antifouling paints (used from 1970s) were soluble matrix type, which provides an initial biocide liberation very fast, however this systems losing the efficiency in 12- 15 months approximately [1]. Later, TBT was used in self-polishing-paints, compatible with steel and aluminum hulls, these paints were based on acrylic copolymer with TBT groups bonded to the main polymer chain by ester bonds [5]. Due the polymer solubility in sea water, the paint dissolution could be controlled at molecular level, this allowed a protective effect lasting with a constant release rate of  $4 \mu\text{g cm}^{-2}$  per day, during until 7 years [6]. Due to the high efficiency of TBT self-polishing-paints, in 1999 it was estimated that almost 70% of all commercial shipping was protected by them, achieving direct savings of approximately US\$ 2,400 million a year in fuel and other costs [1,7]. Furthermore, estimatives showed that approximately 50,000 tons of organotin compounds were produced per year between 1990 and 2003 [5].

Due to intensive use and high TBT toxicity, several environmental deleterious effects have been reported since 1980s in harbors, marinas and shipyards areas related to TBT contamination [8]. Among these harmful effects are: oysters malformation [9],

immunosuppression in dolphins [10], immunotoxicity in fish [11], imposex, and decline of gastropod populations [12]. Hence, in the early 1980s many countries adopted restrictive regulations to the use these marine coatings on ships and later a global ban of antifouling paints TBT based was proposed by International Maritime Organization (IMO) through the International Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems on Ships (AFS convention). According to AFS convention, new applications of these products were banned since 1st January 2003 and its presence on ship surfaces as from 1st January 2008 [13]. However, antifouling paints OTs based are still widely used in several developing countries making it necessary to monitor the global AFS convention effectiveness [14-16].

In aquatic environments, TBT is degraded by dealkylation in progressively less toxic dibutyltin (DBT) and monobutyltin (MBT). This cleavage of the tin-carbon bonds may occur photolytically by UV light, microbiologically by fungi or bacteria, or by chemical attack [17]. Studies of environmental impact for TBT have focused also in chemical determination of DBT and MBT in order to evaluate temporal contamination and trends [18,19]. That requires the availability of accurate and selective technical analysis as Gas Chromatography (GC). Currently, despite the derivatization requirement, GC is the most popular technique employed for the analysis of butyltin compounds (BTs) in environmental matrices, it is often used coupled to flame photometric detector (FPD) [20], pulsed flame photometric detector (PFPD) [21] or mass spectrometer detector (MS) [22].

Some methodological studies have reported matrix effect occurrence in BTs determinations by GC in environmental samples [23-26]. This problem, was first described by Kebarle and Tang in 1993 [27] and occur frequently in biota and sediment samples due strong interactions with matrix interfering [26]. In order to combatting the matrix effect on pesticide analyses has been recently proposed the employ of standard addition method [25], analyze of small sample weight [23], use of appropriate internal standards [28] and

specific clean-up techniques [26]. However there are no studies evaluating matrix effects occurrence in BTs (TBT, DBT and MBT) determinations by GC-MS using derivatization by Grignard reaction.

Additionally, Tributyltin has a low aqueous solubility and relatively high affinity for particulate matter, providing a direct and potentially persistent route of its entry into benthic sediment and biota. The need to determine the fate of TBT in such environments is consequently a priority issue, as the sediment and biota becomes the major reservoir for this pollutant. In order to investigate the IMO prohibition environment effects, many research groups and environment agencies have needed BTs determinations in environmental matrices. This way, the current study aimed evaluates the matrix effect related to the determination of TPrT, TBT, DBT and MBT in estuarine sediments and mussel tissues using GC-MS and Grignard derivatization proposing an effective method to avoid this effect. Besides some modifications in sample preparation proposed by Morabito et al [29] were also applied.

## **Experimental**

### Chemicals

Tributyltin chloride (TBT, 98.2%), Dibutyltin dichloride (DBT, 96.0%), Monobutyltin trichloride (MBT, 95.0%), Tropolone (98.0%) and Phenylmagnesium bromide in *diethylether solution 2M* (Grignard reagent) were purchased from Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, USA). Tripropyltin chloride (TPrT, 98.9%, used as surrogate standard), Tetraethyltin (TeBT, 98.8%, used as internal standard), chloridric acid P.A. and NaCl were obtained from Merck (Darmstad, Germany).

All Butyltins concentrations are reported as Sn (ng Sn mL<sup>-1</sup> and ng Sn g<sup>-1</sup> for liquid solutions and sediments, respectively). The individual organotin stock standard solutions

containing 1 mg Sn mL<sup>-1</sup> were prepared in hexane and stored at 4 °C in amber vials. Working solutions were prepared by appropriate dilution of the stock standard solutions.

Hexane, methanol, dichloromethane and toluene pesticide analysis grade and anhydrous sodium sulphate were purchased from JT Baker (Mallinckrodt, México). Water was purified with a Direct-Q UV3<sup>®</sup> (resistivity 18.2 mΩ cm) water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

All glassware was washed with Extran<sup>®</sup> solution (Merck, 5 % v/v) and submerged in the same solution for 24 hours. After, the glassware was submerged in nitric acid solution (5 % v/v) for 24 hours, washed under flow water and dry at 35 °C. Before the use, all material was rinsed with acetone (3x) and hexane pesticide analysis grade (3x) using a pasteur pipette.

#### Instrument

All analyses were performed in a gas chromatography Perkin Elmer Clarus 500 coupled mass spectrometer and auto sampler. The GC was equipped with a Perkin Elmer column Elite-5MS (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm thickness) coated with 5 % diphenyl dimethylpolysiloxane. The carrier gas was high purity helium (99.999 %) with a constant flow of 1.7 mL min<sup>-1</sup>. The GC oven temperature was programmed as follows: 2 min at 80 °C, to 300 °C at 11 °C min<sup>-1</sup> and constant temperature until final analyses. The injector temperature was 280 °C in split mode. The total analysis time was 13 minutes. The ion source and transfer line temperatures were set at 280 °C. The mass spectrometer was operated in electron ionization mode and electron impact was performed at electron energy of 70 eV. The mass spectra obtained at mass-to-charge ratio scan range from 150 to 450 u to determine appropriate masses for select ion monitoring (SIM). Selected ion monitoring mode was used in quantification. The dwell time was set to 0.1 for each ion.

## Extraction

The extraction techniques for Butyltin compounds were based on the method described by Morabito et al., [29] modifying the final solvent exchange of isooctane to hexane. Exactly 5 g of sediments or 1 g of freeze dried mussel tissues were spiked with a mixture of TPrT, MBT, DBT and TBT in appropriate concentrations and allowing 30 minutes for equilibration. The samples were placed in 40 mL vials and 15 mL of tropolone solution 0.05 % (w/v) in methanol and 1 mL of concentrated HCl (37%) were sequentially added. The vials were put in an ultrasonic bath at a water temperature lower than 40 °C and left under sonication for 15 minutes. The vials were then transferred for centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes. The supernatants were transferred in a 250 mL separatory funnel filled with 150 mL of a 10% NaCl solution. The extraction procedure was repeated for more twice. Later, the initial extracts in separatory funnel were extracted with 20 mL of dichlorometane (3x). The dichlorometane phases are collected through anhydrous sodium sulphate. After washing the sulphate with 2 mL of dichloromethane, the extracts were added of 5 mL of hexane and the volume were approximately reduced to 5 mL in a rotary evaporator at a bath temperature lower than 40 °C and under moderate vacuum. In this step, was accomplished a solvent exchange of dichlorometane to hexane. The concentrated extracts were transferred to a 40 mL vials (screw cap with PTFE septa) and lead to almost dryness under moderate flow of nitrogen. After the volume extracts were completed for 1 mL to perform the derivatization.

## Derivatization

The transformation of butyltin chlorides into more stable compounds was obtained by Grignard reaction. That alkylation is the most widely used derivatization technique for

organotin determination and was performed by pentylation with pentylmagnesium bromide in diethylether solution (2 M) [30].

Initially the 40 mL vials containing the extract were closed and purged with nitrogen to obtain an inert atmosphere. For that step, it was used needles of stainless steel of 15 cm connected the nitrogen line. Later, 2 mL of pentylmagnesium bromide in diethylether solution (2 M) was injected inside the vials with a glass syringe, the vials were vigorously agitated in vortex for 1 minute and allowed to stand for 30 min with occasional agitation. The excess of Grignard reagent was destroyed by adding 15 mL of ultrapure water and 1 mL of HCl (37%) both previously refrigerated to 4 °C. That step was accomplished in ice bath to minimize the evaporation losses.

After derivatization reaction, the pentylated butyltins were removed by a liquid-liquid extraction with 5 mL of hexane (3x). Those extracts were evaporated under moderate nitrogen flow to 0.5 mL and transferred on top of a silica column (3.5 g in a glass column 30 cm length and 15 mm as internal diameter) previously wet with hexane/toluene mixture (1:1). Hexane/toluene mixture (1:1) was passed through the column until 15 mL were collected in a vial. Finally, the solution was concentrated under moderate nitrogen flow to 0.9 mL, added 100 µL of Tetrabutyltin solution 1000 ng Sn mL<sup>-1</sup> and injected in chromatography system.

#### Method validation

The validation process was carried according with defined parameters by Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed of the European Commission [31]. Once the best conditions for butyltin analysis were defined, the validation of the method was carried out according to parameters described as follows.

## Analytical Curves, linearity and matrix effect study

In order to verify the linearity and matrix effect occurrence, for each analyte were constructed three analytical curves: in pure solvent, for matrix superposition (using sediments previously decontaminated by thermal treatment / 450 °C for 6 hours) and for standard addition (mussel tissues). The analytical curves concentrations were 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000 ng Sn mL<sup>-1</sup>. The method linearity was evaluated by the equation of the linear regression ( $y = ax + b$ ) and its square of correlation coefficients ( $R^2$ ). Afterwards, matrix effects were investigated by comparing the slopes in calibration solutions. The ratios,  $S_m/S_s$ , of the slope in matrix ( $S_m$ ), over the slope in solvent ( $S_s$ ), were calculated and the extent of effects due to matrix components was rated according to the % signal enhancement or suppression (C%), which was calculated as:  $\% ME = 100 \times (1 - S_m / S_s)$

## Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ)

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were calculated for a signal to noise (S/N) ratio “peak to peak” obtained by the Turbo Mass software (S/N = 3 to LOD and S/N = 10 to LOQ, respectively) using the peak of the lowest concentration. The determination of the LOD was performed by preparing samples with known concentrations of the analyte and by establishing the level at which the analyte could be reliably detected.

## Precision and Accuracy

In that study the precision was evaluated in terms of repeatability ( $RSD_r$ ) and intermediate precision ( $RSD_{ip}$ ) and was expressed as relative standard deviation (RSD). In order to evaluate repeatability were performed experiments with spiked sediment samples in four concentration levels (2, 4, 20 and 40 ng Sn g<sup>-1</sup>) and in mussel tissues with three

spiked concentrations (10, 20 and 100 ng Sn g<sup>-1</sup>). Each spike level was analyzed in triplicate covering the whole analytical range under study and each extract was injected three times (n=9). The intermediate precision was verified through of experiments intra-day and inter-day accomplished with three fortification levels and different operators, respectively.

In that study the accuracy was evaluates in terms of recovery in spiked samples and certified reference material analyses. For sediments, the analyses were carried out in four concentration levels (2, 4, 20 e 40 ng Sn g<sup>-1</sup>) and in mussel tissues were used three environmental relevant concentrations (10, 20 and 100 ng Sn g<sup>-1</sup>) of TPrT, TBT, DBT and MBT were spiked in sediment samples and analyzed in triplicate (n=9). For TBT, was also tested the level 1,2 ng Sn g<sup>-1</sup> for sediments and 5 ng Sn g<sup>-1</sup> for mussel tissues. Additionally the certified reference material (PACS-2 / National Research Council of Canada, Ottawa, Canada) was analyzed (n=5). All concentrations were reported as ng Sn g<sup>-1</sup> (dry weight).

## **Results and discussion**

The selected chromatography conditions showed a good separation of the analyte with good peak shape and acceptable retention times (Figure 1). Table 1 display the obtained retentions time ( $t_R$ ), relative retentions time ( $t_{RR}$ ) and monitored ions. The chromatography conditions of the validated method provided a short time of analysis (13.29 minutes), in comparison with other proposed methods for BT determinations [32]. Additionally, the use of a versatile column (Elite-5MS - 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu$ m thickness) would facilitate the method implementation to BT analysis in laboratories that already work using GC-MS.



Table 1: Retention time ( $t_R$ ), relative retention time ( $t_{RR}$ ) and monitored ion.

Compounds	$t_R$ (min)	$t_{RR}$ (min)	Monitored Ion
TPrT	9.41	0.87	273, 275, 277
TeBT	10.88	-	177, 233, 235, 291
TBT	11.71	1.07	179, 261, 263, 319
DBT	12.53	1.16	249, 317, 319, 315
MBT	13.31	1.22	193, 317, 319

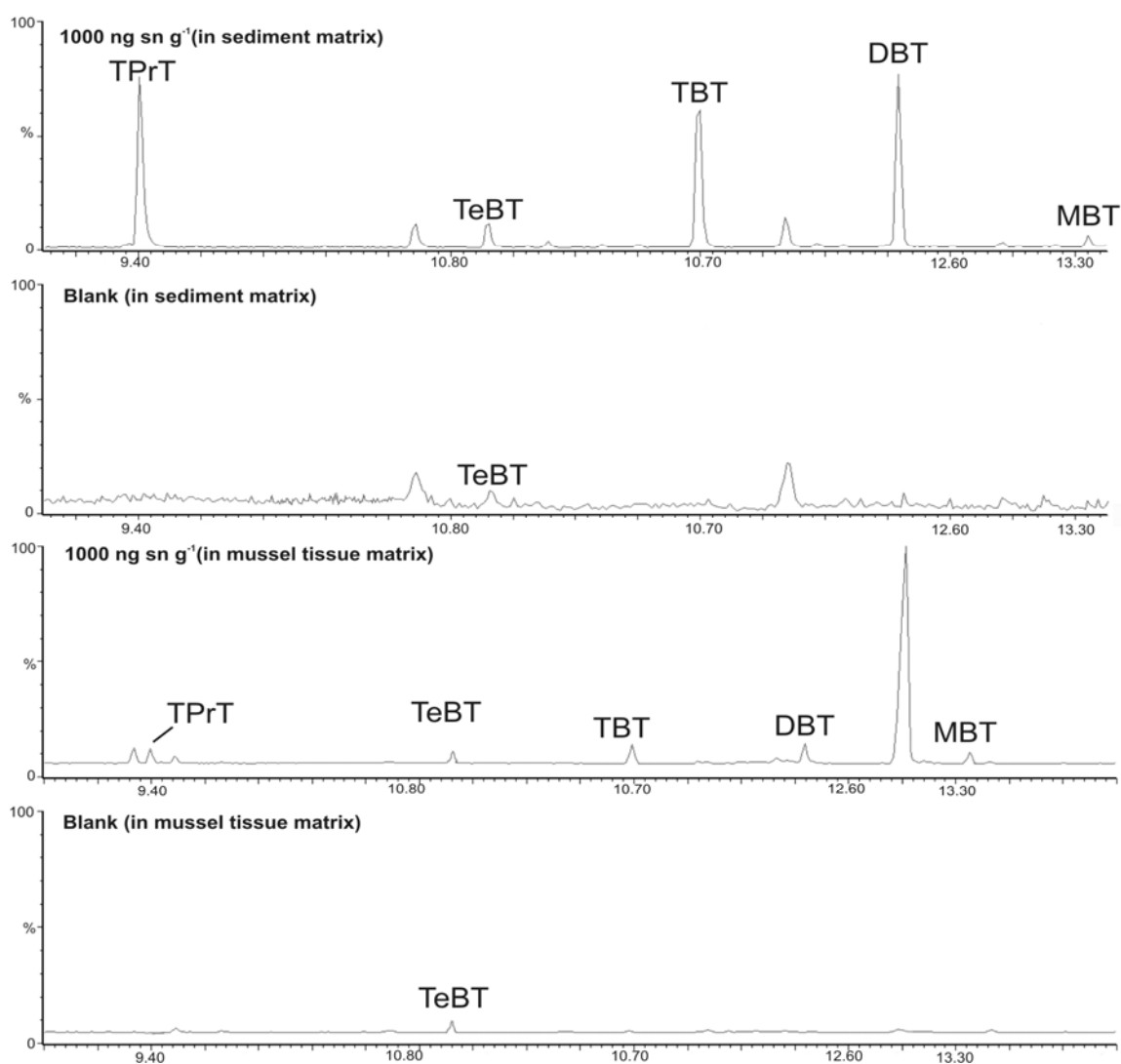


Figure 1: Typical chromatogram of Butyltin compounds in sediments and mussel tissues matrix (spiked and blank). TPrT , TeBT (internal standard), TBT , DBT and MBT. TeBT concentration = 100 ng Sn  $g^{-1}$ , other analites = 1000 ng Sn  $g^{-1}$ .

## Validation

### Analytical curves, linearity, matrix effect study, LOD and LOQ

The analytical curve equations, % ME,  $r^2$ , LOD and LOQ for TPrT, TBT, DBT and MBT in different tested matrices are summarized in the table 2. The obtained square of regression coefficient ( $r^2$ ) for analytical curves to the four studied analytes showed values larger than 0.99 for all matrices.

Table 2: Parameters of the analytical curve in pure solvent<sub>(sol)</sub>, sediment matrix<sub>(sed)</sub> and mussel tissues matrix<sub>(bio)</sub> equation, matrix effect (% ME), square of regression coefficient ( $R^2$ ), instrumental limits of detection (LOD<sub>i</sub>), instrumental limits of quantification (LOQ<sub>i</sub>), sediment method limits of quantification (LOQ<sub>sed</sub>) and biota method limits of quantification (LOQ<sub>bio</sub>) .

Compound	Analytical curve equation	% ME	$R^2$	LOD <sub>i</sub>	LOQ <sub>i</sub>	LOQ <sub>sed</sub>	LOQ <sub>bio</sub>
TPrT <sub>sol</sub>	$y=0.002011660x + 0.0023393$	-	0.9963	3.5	10		
TPrT <sub>sed</sub>	$y=0.000921047x - 0.0028651$	54.2	0.9977	1.5	4.5	0.8	1.5
TPrT <sub>bio</sub>	$y=0.002276220x - 0.0204481$	-12.5	0.9911	0.5	1.5		
TBT <sub>sol</sub>	$y=0.00570193x - 0.00728584$	-	0.9983	2.5	7.5		
TBT <sub>sed</sub>	$y=0.00454291x - 0.01832051$	20.3	0.9980	0.8	2.5	0.5	2.0
TBT <sub>bio</sub>	$y=0.00752929x - 0.03587190$	-32.0	0.9950	0.7	2.0		
DBT <sub>sol</sub>	$y=0.00595851x - 0.00415379$	-	0.9972	5.0	15		
DBT <sub>sed</sub>	$y=0.00514563x - 0.02247480$	13.6	0.9960	1.0	2.0	0.5	2.0
DBT <sub>bio</sub>	$y=0.00241850x - 0.02520004$	59.4	0.9958	0.7	2.0		
MBT <sub>sol</sub>	$y=0.00091140x + 0.00083390$	-	0.9955	3.5	10		
MBT <sub>sed</sub>	$y=0.00140020x + 0.00417327$	-53.6	0.9914	0.7	2.0	0.5	1.5
MBT <sub>bio</sub>	$y=0.00031220x + 0.00242932$	65.7	0.9945	0.5	1.5		

Through the comparison between analytical curve equations was verified a suppression or enhancement of the signal in BTs analyses related tested matrix. According to Krueve et al., [33] signal changes generated by matrix effect larger than 20 % are extremely significant and may cause false negative or positive results at lower concentrations, therefore precautions must be taken to minimize this effect. Although some studies suggest the use of internal standards and implementation of clean-ups techniques to minimize the matrix effects in pesticide analyses [26,28], our results showed that these procedures have not been able to avoid efficiently the matrix effect in BTs analyses by GC-MS. Therefore was necessary to use techniques of standard addition and superposition of the matrix for biota and sediments respectively. This procedure had been used by Gallego-Gallegos et al., [26] for ethiled BT determinations in environmental matrices using GC-FPD, however had not yet been tested for BTs derivatized by Grignard reaction with quantification in GC-MS.

In the analytical curve prepared in pure hexane the LOD were 3.5, 2.5, 5.0 and 3.5 ng Sn mL<sup>-1</sup> for TPrT, TBT, DBT and MBT respectively, however, in the matrix curves a improvement in LOD and consequently in LOQ were gotten. The obtained LOD in sediment curves were 1.5, 0.8, 1.0 and 0.7 ng Sn mL<sup>-1</sup> similarly for mussel curves the LOD values were 0.5, 0.7, 0.7 and 0.5 ng Sn mL<sup>-1</sup> respectively for TPrT, TBT, DBT and MBT. These results are in accordance with other chromatographic studies that showed similar improvement in the LOD when the matrix effect is effectively prevented [34-36].

Sample dilution and smaller sample injection reduces the amounts of interference molecules injected in chromatography systems, this easiest approach is often used in laboratories to minimize the matrix effect in pesticide analyses [37]. However, the use of these techniques impairs the application of pre-concentration

strategies which are necessary to quantify BTs in environmental levels. Considering the used sample weight (5g to sediments and 1g to mussel tissues), the LOQ values for sediment (0.8, 0.5, 0.5 and 0.5 ng Sn g<sup>-1</sup> for TPrT, TBT, DBT and MBT respectively) and Biota samples (1.5, 2.0, 2.0 and 1.5 ng Sn g<sup>-1</sup> for TPrT, TBT, DBT and MBT respectively), are consistent with environmental relevant concentrations found worldwide [38].

### Precision and Accuracy

The term precision is defined by the ISO International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (ISO-VIM) as the closeness of agreement between quantity values obtained by replicate measurements of a quantity under specified conditions [39,40]. For sediments, considering all analyzed compounds and spike levels, the recovery values ranged between 92.7 and 117.1 % with RSD<sub>r</sub> as from 1.1 to 16.4%. Besides, in terms of intermediate precision, the obtained recoveries were between 78.5 and 110.0 % with RSD<sub>ip</sub> ranging between 3.0 and 18.3 (Table 3).

Similarly, for biota matrix, these values ranged as from 72.0 to 118.2 % with RSD<sub>r</sub> between 0.8 and 12.2%. Additionally, in mussel tissues the recoveries to intermediate precision were between 78.3 and 119.4 % with RSD<sub>ip</sub> as from 0.7 to 11.4% (Table 4). These values are in accordance with the norms of the Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed of the European Commission [31]. Accuracy is the degree of agreement between the experimental values, obtained by replicate measurements. Several approaches have been suggested to evaluate the accuracy of a method. The main strategies currently used to assess the accuracy are: (1) measuring the analyte in a particular reference material and comparing the result with the certified value, (2) measuring the analyte in blank matrix samples spiked with known analytical concentrations and determining the percentage of

recovery, (3) comparing the results from the method under validation with those from a reference method and (4) determining the analytical concentration in the sample by means of the standard addition technique [39].

Table 3: Recovery, repeatability ( $RSD_r$ ) and intermediate precision ( $RSD_{ip}$ ), of the method, for mixture of TPrT, TBT, DBT and MBT sediment spiked at different levels (n=9).

Compound	Spike level ng Sn g <sup>-1</sup>	Recovery (%)	$RSD_r$ (%)	Recovery <sub>pi</sub> (%)	$RSD_{pi}$ (%)
TPrT	2	97.7	10.8	78.5	18.3
	4	92.7	8.0	81.3	16.4
	20	106.3	16.4	89.3	14.5
	40	101.2	5.8	96.6	7.9
TBT	1.2	107.9	14.6	93.3	12.5
	2	104.3	6.3	97.6	11.4
	4	105.4	2.0	98.5	6.3
	20	101.3	1.1	98.3	7.1
	40	100.0	2.4	99.3	4.5
DBT	2	117.1	9.2	110.0	9.9
	4	97.5	7.6	88.2	8.6
	20	104.2	9.2	91.3	3.0
	40	99.6	3.8	98.6	4.5
MBT	2	97.2	9.1	94.5	16.3
	4	93.8	6.1	83.7	14.5
	20	95.7	6.2	90.3	9.1
	40	96.5	3.6	85.6	7.7

As mentioned above, in spiked matrix, the obtained recoveries were inside of the acceptable range. However, reference material analyses are the most powerful tools for quality control of measurements [41]. The obtained results in Certified Reference material (PACS-2 / n =5) analyses were TBT = 871 ± 36 ng Sn g<sup>-1</sup>; DBT = 1012 ± 22 ng Sn g<sup>-1</sup> and MBT = 713 ± 42 ng Sn g<sup>-1</sup>. These values are in good agreement with the certified (TBT = 890 ± 105 ng Sn g<sup>-1</sup> and DBT = 1047 ± 64 ng Sn g<sup>-1</sup>) and reported values (MBT = 600 ng Sn g<sup>-1</sup>) for this material.

Table 4: Recovery, repeatability ( $RSD_r$ ) and intermediate precision ( $RSD_{ip}$ ), of the method, for mixture of TPrT, TBT, DBT and MBT in mussel tissue spiked at different levels (n=9).

Compound	Spike level ng Sn g <sup>-1</sup>	Recovery (%)	$RSD_r$ (%)	Recovery <sub>pi</sub> (%)	$RSD_{pi}$ (%)
TPrT	10	83.0	0.8	89.5	4.7
	20	72.0	1.9	78.3	3.1
	100	94.6	12.2	92.5	2.6
TBT	5	112.9	10.3	-	-
	10	101.1	2.1	100.7	2.5
	20	98.7	2.3	96.3	2.0
	100	101	1.6	98.2	0,7
DBT	10	112.0	1.2	108.0	4.6
	20	88.9	1.7	101.8	8.2
	100	93.2	2.5	98.4	2.1
MBT	10	118.2	4.2	119.4	10.2
	20	106.1	5.9	108.3	9.4
	100	105.5	10.4	110.6	11.4

## Conclusions

Our results confirm non negligible matrix effect in sediments and mussel tissues during butyltin analyses using GC-MS and Grignard derivatization. However, this effect can be easily combated for the preparation of the analytical curves using standard addition or superposition techniques. The analytical method proved to be effective for the determination of butyltin compounds in sediments and mussel tissues.

## Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq, for the financial support I. B. Castro (PhD grant 141550/2007) and G. Fillmann (PQ 311459/2006-4) were sponsored by CNPq (Brazilian National Research Council).

## References

- [1] E. Almeida, T.C. Diamantino, and O. de Sousa, Marine paints: The particular case of antifouling paints, *Prog. Org. Coat.*, 59 (2007) 2-20.
- [2] D.M. Yebra, S. Kiil, and K. Dam-Johansen, Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings, *Progress in Organic Coatings*, 50 (2004) 75-104.
- [3] M.A. Champ, A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits, *Sci. Total Environ.*, 258 (2000) 21-71.
- [4] A. Kotrikla, Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards, *J. Environ. Manag.*, 90 (2009) S77-S85.
- [5] A.F.L. Godoi, R. Favoreto, and M. Santiago-Silva, Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos., *Quím. Nova*, 26 (2003) 708-716.
- [6] C. Swennen, N. Ruttanadakul, S. Ardseungnern, H.R. Singh, B.P. Mensink, and C.C. ten Hallers-Tjabbes, Imposex in sublittoral and littoral gastropods from the Gulf of Thailand and strait of Malacca in relation to shipping, *Environ. Technol.*, 18 (1997) 1245-1254.
- [7] E.L. Clark, R.M. Sterrit, and J.N. Lester, The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment a Look at the Data., *Env. Sci. Tech.*, 22 (1988) 600-604.
- [8] D.M. Yebra, S. Kiil, and K. Dam-Johansen, Antifouling technology: past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings, *Prog. Org. Coat.*, 50 (2004) 75-104.
- [9] C. Alzieu, Impact of tributyltin on marine invertebrates, *Ecotoxicology*, 9 (2000) 71-76.
- [10] J. Yang, N. Miyazaki, T. Kunito, and S. Tanabe, Trace elements and butyltins in a Dall's porpoise (*Phocoenoides dalli*) from the Sanriku coast of Japan, *Chemosphere*, 63 (2006) 449-457.
- [11] A. Nakayama, H. Segner, and S. Kawai, Immunotoxic Effects of Organotin Compounds in Teleost Fish, in: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (Eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*, Springer, Tokyo, 2009, pp. 207-218.
- [12] T. Horiguchi, M. Kojima, F. Hamada, A. Kajikawa, H. Shiraishi, M. Morita, and M. Shimizu, Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations, *Environ. Health Perspect.*, 114 (2006) 13-19.
- [13] T. Senda, International Trends in Regulatory Aspects, in: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (Eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*, Tokyo, 2009, pp. 23-34.

- [14] H.H. Shi, C.J. Huang, X.S. Zhu, X.J. Yu, and W.Y. Xie, Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 304 (2005) 179-189.
- [15] G. Bigatti, M.A. Primost, M. Cledón, A. Averbuj, N. Theobald, W. Gerwinski, W. Arntz, E. Morriconi, and P.E. Penchaszadeh, Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S), *Mar. Pollut. Bull.*, 58 (2009) 695-701.
- [16] S. Lee, J. Chung, H. Won, D. Lee, and Y.W. Lee, Analysis of antifouling agents after regulation of tributyltin compounds in Korea, *J. Hazard. Mater.*, 185 (2011) 1318-1325.
- [17] G.M. Gadd, Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate, *Sci. Total Environ.*, 258 (2000) 119-127.
- [18] S. Diez and J.M. Bayona, Butyltin occurrence and risk assessment in the sediments of the Iberian Peninsula, *J. Environ. Manag.*, 90 (2009) S25-S30.
- [19] N.S. Kim, W.J. Shim, U.H. Yim, S.Y. Ha, J. An, and K.H. Shin, Three decades of TBT contamination in sediments around a large scale shipyard, *J. Hazard. Mater.*, In Press, Accepted Manuscript.
- [20] X. Wang, H. Hong, D. Zhao, and L. Hong, Environmental behavior of organotin compounds in the coastal environment of Xiamen, China, *Mar. Pollut. Bull.*, In Press, Corrected Proof (2008).
- [21] C.R. Oliveira, D.M. Santos, L.A. Santos Madureira, and M.R.R. Marchi, Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors, *J. Hazard. Mater.*, 181 (2010) 851-856.
- [22] N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, G. Gatidou, R. Morabito, P. Massanisso, and T.D. Lekkas, Occurrence of organotin compounds in the aquatic environment of Greece, *Water Air Soil Pollut.*, 181 (2007) 201-210.
- [23] C.H. Tang and W.H. Wang, Optimization of an analytical method for determining organotin compounds in fish tissue by base-hydrolysis pretreatment and simultaneous ethylation-extraction procedures, *Anal. Chim. Acta*, 581 (2007) 370-376.
- [24] I.R. Pereiro, V.O. Schmitt, J. Szpunar, O.F.X. Donard, and R. Lobinski, Speciation Analysis for Organotin Compounds in Biomaterials after Integrated Dissolution, Extraction, and Derivatization in a Focused Microwave Field, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 4135-4140.
- [25] N. Cardellicchio, S. Giandomenico, A. Decataldo, and A. Di Leo, Speciation of butyltin compounds in marine sediments with headspace solid phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369 (2001) 510-515.



- [26] M. Gallego-Gallegos, M. Liva, R.M. Olivas, and C. Cámara, Focused ultrasound and molecularly imprinted polymers: A new approach to organotin analysis in environmental samples, *J. Chromatogr. , A*, 1114 (2006) 82-88.
- [27] P. Kebarle and L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 972A-986A.
- [28] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, and Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 2198-2207.
- [29] R. Morabito, S. Chiavarini, and C. Cremisini, Speciation of organotin compounds in environmental samples by GC-MS, in: Ph. Quevauviller, E.A. Maier, and B. Griepink (Eds.), *Quality Assurance for Environmental Analysis*, Elsevier Science, Amsterdam, 1995, pp. 435-464.
- [30] R. Morabito, P. Massanisso, and P. Quevauviller, Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 113-119.
- [31] SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analyses in food and feed. 10684, -53. 2009. European Commission. Ref Type: Report
- [32] C.C. Chou and M.R. Lee, Determination of organotin compounds in water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. , A*, 1064 (2005) 1-8.
- [33] A. Krueve, A. K<sup>3</sup>nnapas, K. Herodes, and I. Leito, Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. , A*, 1187 (2008) 58-66.
- [34] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, and J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *Journal of Chromatography B*, 852 (2007) 22-34.
- [35] L. Carrasco, S. Díez, and J.M. Bayona, Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction: Matrix effect evaluation, *J. Chromatogr. , A*, 1174 (2007) 2-6.
- [36] J.H. Iová and J. Zrostlíková, Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *J. Chromatogr. , A*, 1000 (2003) 181-197.
- [37] M.D. Hernando, J.M. Suárez-Barcena, M.J.M. Bueno, J.F. Garcia-Reyes, and A.R. Fernandez-Alba, Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food, *J. Chromatogr. , A*, 1155 (2007) 62-73.
- [38] I.B. Castro, F.C. Perina, and G. Fillmann, Review of organotins contamination in South America. *Environmental Monitoring and Assessment* . 2011. Ref Type: In Press

- [39] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 2224-2234.
- [40] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, and L.c.F.C. Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quím. Nova*, 27 (2004) 771-780.
- [41] M. Ceulemans and F.C. Adams, Evaluation of sample preparation methods for organotin speciation analysis in sediments -- focus on monobutyltin extraction, *Anal. Chim. Acta*, 317 (1995) 161-170.

## **CAPÍTULO IV – Contaminação por COE na Costa Oeste da América do Sul**

A revisão apresentada no Capítulo I demonstra que os níveis da contaminação por compostos orgânicos de estanho são praticamente desconhecidos para algumas regiões. Sendo assim, foram produzidos dois artigos científicos visando minimizar esta lacuna de conhecimento sobre os níveis de COE na costa oeste da América do Sul. O primeiro artigo trata da ocorrência de imposex em gastrópodes e da contaminação por butilostânicos em sedimentos da costa do Equador, estando aceito para publicação no periódico “*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*” com o título “*Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador*”. O segundo artigo científico intitulado “*High TBT and imposex levels in a commercial muricid (Stramonita chocolata) from two Peruvian harbor areas*” refere-se à ocorrência de imposex e níveis de organostânicos em tecidos de moluscos gastrópodes coletados em duas importantes áreas portuárias da costa peruana. Esse artigo está submetido para possível publicação no periódico “*Ecological Indicators*”.

## Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador

Ítalo Braga Castro<sup>1\*</sup>, Maria Fernanda Arroyo<sup>2</sup>, Patrícia Gomes Costa<sup>1</sup>

& Gilberto Fillmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Inst. de Oceanografia, Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO). Rio Grande – RS – Brazil 96201-900

\*Corresponding author: italobraga@gmail.com

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador

### Abstract

The first appraisal of butyltins (BTs) contamination linked with imposex incidence in Pacific coast of South America was performed in the current study. Imposex occurrence was analyzed in 3 muricid species (*Thais biserialis*, *Thais brevidentata* and *Thais kiosquiformis*) distributed along 14 sites from the coastal areas of Ecuador. All studied muricids have shown imposex, which was observed in 11 out of 14 sites. The highest imposex levels were observed in *Thais kiosquiformis* collected inside the Gulf of Guayaquil (RPLI = 9.0 - 40.7), while RPLI values for *Thais biserialis* and *Thais brevidentata* ranged between 4.0 and 26.1 and 0.0 and 1.9, respectively. Additionally, butyltin compounds (TBT, DBT and MBT) were determined in surface sediments collected in 6 of those sites (main harbor areas) and values ranged between 12.7 and 99.5 ng Sn g<sup>-1</sup> (dw) for TBT, 1.8 and 54.4 ng Sn g<sup>-1</sup> for DBT, and 44 and 340 ng Sn g<sup>-1</sup> for MBT. Although butyltin degradation indexes suggested an aged input of TBT, the high imposex levels detected in the current study suggest a probable recent exposition and indicate that TBT use restrictions might not be as effective as expected. Considering that southern coast, especially nearby harbors inside Gulf of Guayaquil, have shown to be contaminated by BTs, a combination of *Thais kiosquiformis* and *Thais biserialis* (the most sensitive species) can be used for future biomonitoring of Ecuador coastal areas.

**Keywords:** antifouling; organotin; South America; Gulf of Guayaquil; muricid

## Introduction

Tributyltin (TBT) is a very toxic synthetic organic compound that has been released into the environment throughout anthropogenic activities (Bryan et al. 1988). It was introduced into international market of antifouling paints during the 1960s and its use rapidly expanded due to its reduced cost and great efficiency (Almeida et al. 2007). Due to its intensive use TBT has been detected since the 80's in coastal areas around the world associated to intense maritime activities (Evans 1999) and there has been plenty of indication of its harmful effects on the environment (i.e. imposex in marine gastropods, malformation in oysters and hormonal imbalance in dolphins (Horiguchi 2009). As a result, a Convention banning TBT-based antifouling paints was adopted in 2001 by the International Maritime Organization (IMO), but it was only put in force in September of 2008(IMO 2008). However, TBT persistence in marine sediments may vary within 2 to 20 years and it is dependent on various oceanographic factors (Mora and Phillips 1997). Hence, it is expected that the TBT effects will be felt by the marine environment for some years ahead (Sousa et al. 2009). This is particularly relevant in estuaries and closed bays with restricted circulation, where there are, usually, also harbor terminals, marinas and fishing fleet (Yamamoto et al. 2009).

One of the most well-known effects of the exposure to butyltin compounds (BTs) is imposex, which is defined as a superimposition of male sexual characters, such as a penis and a *vas deferens*, onto females gastropods exposed to organotin compounds (OTs) (Gibbs and Bryan 1987). This phenomenon is the result of an unknown endocrine disruption in Prosobranch gastropods (Porte et al. 2006; Sternberg et al. 2010) and it was first reported by Blaber (1970) in the caenogastropod *Nucella lapillus*. Nowadays the imposex is a widespread problem, affecting approximately 195 Prosobranch species (Shi et al. 2005; Sternberg et al. 2010). The occurrence and intensity of imposex is

reasonably accepted as proportional to the environmental levels of OTs compounds, with a clear cause and effect relationship (Matthiessen and Gibbs 1998). Thus, such alteration is a powerful biomarker, which has been worldwide used to map tributyltin (TBT) contamination hotspots in the coastal environment (Sousa et al. 2009).

In South America, some studies have already showed the extension of OTs contamination in the Atlantic coastal areas (Fernandez et al. 2005; Oliveira et al. 2010; Bigatti et al. 2009). Imposex levels in many species of marine gastropods (Castro et al. 2008) and organotin compounds levels in surface sediments have been reasonably studied in the main harbor areas of the Brazilian and Argentinean coastline (Castro et al. 2007a; Fernandez et al. 2005; Bigatti et al. 2009; Miloslavich et al. 2007). On the other hand, very few studies have reported imposex in the Pacific coast of South America (Huaquin et al. 2004; Gooding et al. 1999) and only a recent publication quantified BTs contamination in surface sediments from Chile (Pinochet et al. 2009). However, none of these studies have ever integrated the information about organotin quantification and imposex occurrence in the Pacific coast of South America (Castro et al. 2011).

Despite the fact that contamination levels in the Ecuadorian coastal shore are unknown, the Gulf of Guayaquil (3°S, 80°W) is the largest estuarine ecosystem (12000 km<sup>2</sup>) on the Pacific coast of South America. In fact, this system is cited as one of the most severely threatened of this region (Bryant et al. 1995). In addition, at the mouth of the Guayas River lies Guayaquil, Ecuador's largest city (over 2 million inhabitants). In the heart of the Gulf, the city's demands for estuarine resources are intense, and exploitation of coastal resources is often poorly regulated due to lack of management (Aguirre and Shervette 2005). Additionally, it shelters 2 out of 4 larger harbors of the country (Guayaquil and Bolivar harbors) and there are many fishing ports along its

coastline. Another problem is the fact that Ecuador has no restrictions to antifouling application (including TBT), and the Gulf of Guayaquil is probably an ecosystem already impacted by butyltin compounds. Therefore, there is a critical need to understand the actual status of organotin contamination in Ecuador to be able to verify the effectiveness of BTs global banning along time and to gather information to support further regulatory strategies.

Thus, the present research represents the first appraisal of BTs contamination linked with imposex incidence in west coast of South America. The study aimed at determining the butyltin (BTs) concentrations in surface sediments and verify the imposex occurrence in 3 muricid species (*Thais brevidentata*, *Thais biserialis* and *Thais kiosquiformis*) from areas under the influence of harbors along the Gulf of Guayaquil and adjacent coastal areas of Ecuador. Additionally, a preliminary comparative study about differential sensibility among the 3 studied species was also accomplished.

## **Materials and Methods**

### **Samples**

All samples (sediments and gastropods) were taken during September of 2009. Surface sediments (upper 2 cm) were collected at 6 sites (S8, S9, S10, S12, S13 and S14) along the coastal areas inside the Gulf of Guayaquil (Figure 1). Sites dominated by coarse sediments (>90% sand) were not sampled (8 out of 14). Sampled sediments were frozen (-20°C) for subsequent analysis. Up to 30 adult specimens of *Thais kiosquiformis*, *Thais biserialis* or *Thais brevidentata* were caught in 14 intertidal sites (either manually or by free diving) distributed along approximately 300 km inside the Gulf of Guayaquil and adjacent coastal area of Ecuador. The sites inside the Gulf of Guayaquil were the same as the ones where the sediments samples were taken from

(Figure 1). In order to accomplish a comparative sensibility evaluation, whenever possible, more than one gastropod species were collected in the same area.

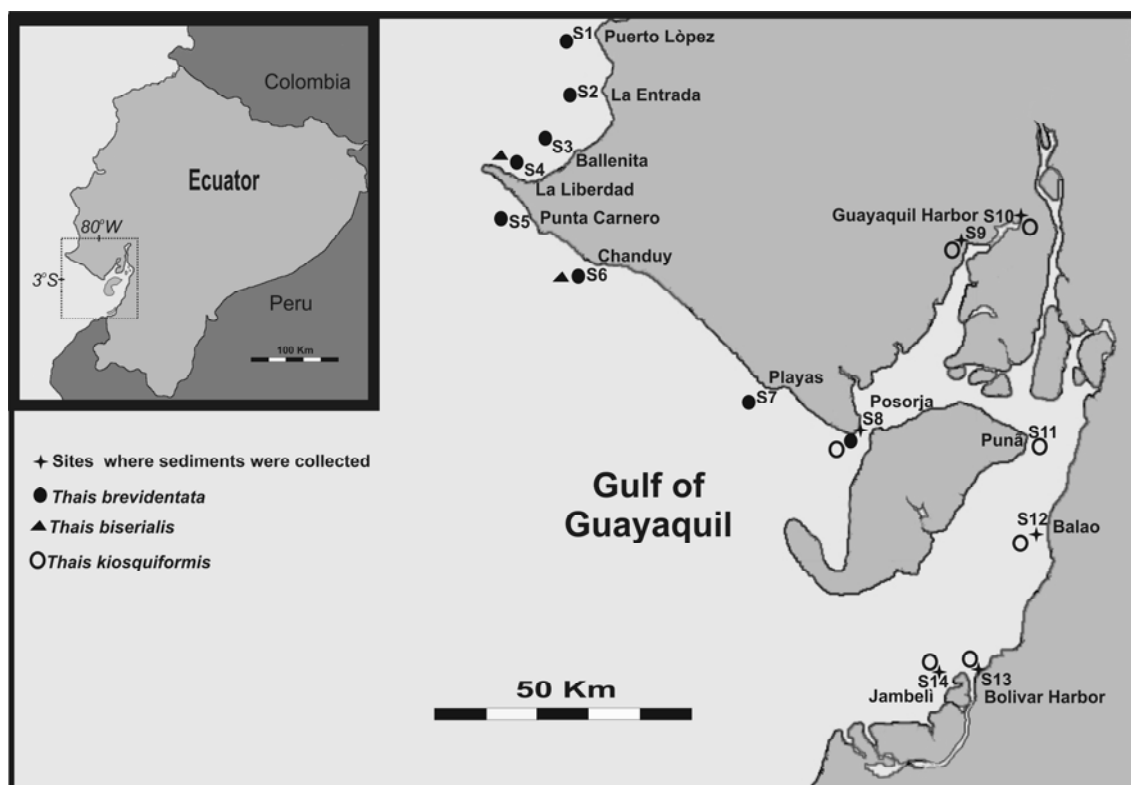


Figure 1: Sampling sites (S) of sediments and gastropods in the Ecuadorian coastal shore. (✦) surface sediments; (●) *Thais brevidentata*; (▲) *Thais biserialis*; (○) *Thais kiosquiformis*.

### Sediment Characterization

Total organic carbon (% TOC) in sediment samples was analyzed by an Elementary Analyzer (CHNS Perkin Elmer 2400 Series II), after decarbonated in a desiccator containing HCl (37%). Sediment granulometry was measured as percent of fine sand, silt and clay, as described by Gray (1981).

### Butyltin analysis

Butyltin (TBT, DBT and MBT) levels were analyzed following the following procedure (Castro et al, *submitted*). Approximately 5 g of dry sediment samples were



placed in 40 mL vials, spiked with a 100 ng of tripropyltin (TPrT) as surrogate standard and left for equilibration (30 min.). Afterwards, 15 mL of tropolone solution (0.05% w/v) in methanol and 1 mL of concentrated HCl (37%) were added. The vials were ultra-sonicated for 15 minutes and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. This procedure was repeated three times. The supernatants were transferred to a 250 mL separatory funnel filled with 150 mL of a 10% NaCl solution and extracted with 3 x 20 mL of dichloromethane. This extract was collected through anhydrous sodium sulphate and added to 5 mL of hexane. The volume was reduced to approximately 2 mL in a rotary evaporator at 40°C. The extracts were then transferred to a 40 mL vials (screw cap with PTFE septa) and derivatized by adding 2 mL of n-pentyl magnesium bromide in diethyl ether solution (2 M). The vials were vigorously agitated using a vortex mixer for 1 minute and allowed to stand for 30 min with occasional agitation. The excess of Grignard reagent was destroyed by adding 15 mL of ultrapure water and 1 mL of HCl (37%), both previously refrigerated at 4 °C. That step was accomplished on ice bath to minimize the evaporation losses (Morabito et al. 2000).

After derivatization, the pentylated butyltins were removed by a liquid-liquid extraction with 3 x 5 mL of hexane. Those extracts were evaporated down to 0.5 mL under moderate nitrogen flow and transferred on top of a silica-gel column (3.5 g) previously wet with hexane/toluene (1:1). Hexane/toluene (1:1) was passed through the column until 15 mL could be collected to a vial. Finally, the solution was concentrated down to 0.9 mL, under moderate nitrogen flow, and 100 µL of tetrabutyltin solution (1000 ng Sn mL<sup>-1</sup>) was added as internal standard. Extracts were analyzed in a Perkin Elmer Clarus 500MS gas chromatographer equipped with mass spectrometer detector and auto sampler. The GC was equipped with an Elite-5MS (5% diphenyl/95%

dimethyl polysiloxane) capillary column (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness).

The quality assurance and quality control was based on regular analyses of blanks, spiked matrices and certified reference material (PACS-2 / National Research Council of Canada, Ottawa, Canada). Results obtained for the PACS-2 (TBT -  $871 \pm 36$  ng Sn g<sup>-1</sup>; DBT -  $1012 \pm 22$  ng Sn g<sup>-1</sup> and MBT -  $713 \pm 42$  ng Sn g<sup>-1</sup>) were in good agreement with the certified (TBT -  $890 \pm 105$  ng Sn g<sup>-1</sup> and DBT -  $1047 \pm 64$  ng Sn g<sup>-1</sup>) and reported values (MBT - 600 ng Sn g<sup>-1</sup>). The samples recoveries were between 78% and 107% and RSD (relative standard deviation) below 20% (IUPAC 2002). All concentrations were reported as ng Sn g<sup>-1</sup> (dry weight).

#### Imposex determination

The organisms were previously narcotized with a 3.5% MgCl<sub>2</sub> solution for 2 hours. Shells were then measured with a digital caliper (0.01mm) from the spiral top to lip of siphonal canal. Thus, shells were removed for the analysis of the soft tissues. Gender identification was based on the presence or absence of sexual accessory glands (albumen, capsule and seminal receptacle). The penis length and the presence of vas deferens in females and males were noted at the same time.

The imposex levels were assessed using the following indices: % of imposex in females (I%), Female Penis Length index (FPLI= mean penis length of all females in the population, including the zero values), Relative Penis Length Index (RPLI= [mean penis length in females / mean penis length in males] x 100) (Gibbs et al. 1987). The vas deferens sequence index (VDSI), based on the development of male sexual characters (particularly the vas deferens) by females, was also calculated according Gibbs et al.(1987).

## Statistical analysis

The BTs concentrations and imposex data were tested for normality and homogeneity using the Kolmogorov-Smirnoff and Levene tests, respectively. Pearson correlation analysis was performed to investigate the relationship among chemical concentrations (TBT, DBT and MBT) and imposex levels (RPLI, FPLI and VDSI). Additionally, granulometry, % TOC and BTs concentrations correlations were also tested. All statistic analyses were accomplished by Statistica® (version 6.0) with a significance level of 0.05.

## Results and Discussion

### Granulometry and total organic carbon

All six samples taken from Gulf of Guayaquil were dominated by fine sediments (between 87% (S13) and 98% (S8 and S14)), while those from the adjacent coast were dominated by coarse sediments (>90% sand). The concentrations of total organic carbon (% TOC) in surface sediments collected from those six sites varied from 0.6% (S12) to 3.2% (S14) (Table 1) and no significant correlations ( $p > 0.05$ ) were found with BTs concentrations. In the literature, contradictory results have been reported between % TOC and BTs levels correlations (Pinochet et al. 2009). For example, Shim et al. (1999) demonstrated little or no correlations for these parameters in surface sediments from an enclosed bay system in Korea. Conversely, Pinochet et al. (2009) showed good relationships among % TOC, TBT and DBT concentrations in marine sediments from San Vicente bay (Chile). According to Town and Filella, (2002) this unexpected behavior can be due to the inherent physicochemical sediment complexity such as, different composition of organic matter, relative adsorbability on inorganic particles and the existence of biological activity in the sediment layers.

Table 1: Percentage of fine sediments, total organic carbon (%TOC), butyltin concentrations (ng Sn g<sup>-1</sup> dw) and butyltin degradation indexes in the sediments sampled at the Gulf of Guayaquil.

Sampling site	% TOC	TBT	DBT	MBT	ΣBTs	BDI	%BTs <sub>Deg</sub>
Posorja (S8)	1.05	35.7	8.2	102.2	146.2	3.1	75.5
Guayaquil harbor (S9)	2.31	48.6	15.5	110.3	174.4	2.6	72.1
Guayaquil harbor (S10)	2.13	40.9	6.3	68.7	115.8	1.8	64.7
Balao (S12)	0.59	17.2	1.8	190.8	209.8	11.2	91.8
Bolivar harbor (S13)	2.25	99.5	54.4	339.9	493.7	4.0	79.8
Jambeli (S14)	3.21	12.7	14.2	43.9	70.8	4.6	82.0

#### Butyltin contamination in sediment

BTs residues were detected in all sediment samples collected in the Gulf of Guayaquil (Table 1). TBT, DBT and MBT concentrations ranged from 12.7 to 99.5, from 1.8 to 58.4 and from 43.9 to 339.9 ng Sn g<sup>-1</sup>, respectively. The higher TBT concentrations (> 35 ng Sn g<sup>-1</sup>) were found in Posorja (S8), Guayaquil harbor (S9 and S10) and Bolivar harbor (S13). These sites were adjacent to commercial harbor terminals, where the marine traffic was characterized by ships of big draught. On contrary, the lowest TBT levels were found in areas with activities restricted to small fishing and touristic boats, such as Balao (S12 - 17.2 ng Sn g<sup>-1</sup>) and Jambeli (S14 - 12.7 ng Sn g<sup>-1</sup>). In comparison to other South American sites, Gulf of Guayaquil can be considered as moderately contaminated by BTs if compared to TBT levels that can reach up to 3228 ng Sn g<sup>-1</sup> in Bahía Blanca (Argentina) (Delucchi et al. 2006), 2796 ng Sn g<sup>-1</sup> in Paranaguá bay (Brazil)(Santos et al. 2009) and 1560 ng Sn g<sup>-1</sup> in San Vicente bay (Chile)(Pinochet et al. 2009) (Table 2). However, these comparisons must be analyzed carefully since field data could be influenced by the local characteristics of several environmental factors and sampling date.

Table 2: Butyltin concentrations (ng Sn g<sup>-1</sup> dw) in different sediments of South American environments.

Location / Country	Sample year	Concentration range of BTs species (ng Sn g <sup>-1</sup> )		
		TBT	DBT	MBT
Coast of São Paulo, Brazil (Godoi et al. 2003)	1998	< 12 - 847	14 - 421	< 3 - 367
Guanabara bay, Brazil (Almeida et al. 2004)	2001	< 2 - 742	< 2 - 90	< 3 - 21
Guanabara bay, Brazil (Fernandez et al. 2005)	2000	10 - 522	< 5 - 395	< 5
Paranaguá bay, Brazil (Santos et al. 2009)	2006	0 - 2796	0 - 870	0 - 4063
Todos os Santos bay, Brazil (Felizzola et al. 2008)	2003	< 5 - 16	< 1 - 29	< 2 - 4
Southern Brazilian harbors, Brazil (Oliveira et al. 2010)	2007	0 - 1137	0 - 394	0 - 312
Bahía Blanca, Argentina (Delucchi et al. 2006)	2004	0 - 3228	0 - 1645	n.a.
San Vicente bay, Chile (Pinochet et al. 2009)	2006	2 - 1560	5 - 1170	< 27 - 470
<b>This study</b>	<b>2009</b>	<b>13 - 99</b>	<b>1.8 - 58</b>	<b>44 - 340</b>

n.a. – non available data

The TBT concentrations showed a significant ( $p < 0.05$ ) correlation with DBT ( $r^2 = 0.80$ ) and MBT ( $r^2 = 0.61$ ) concentrations, suggesting that DBT and MBT residues have been probably originated by the degradation of TBT present in antifouling paints (Díez et al. 2006). This pattern has also been observed elsewhere (Oliveira et al. 2010; Pinochet et al. 2009; Choi et al. 2010; Díez and Bayona 2009). In aquatic environments, BTs degradation through dealkylation (TBT→DBT→MBT and inorganic tin) occurs via biotic and abiotic reactions (Maguire 1984). The degradation mechanism is accelerated by UV radiation, increasing temperature, and biological activity (Clark et al.

1988). Thus, high TBT levels suggest recent BT input into the environment. However, when the sedimentary levels of DBT and MBT are higher, the TBT contamination is considered to be aged or, alternatively, were affected by quick degradation processes (Oliveira et al. 2010).

In order to assess the degree of TBT degradation and to predict if the contamination in Gulf of Guayaquil is recent or not, two degradation indices for BTs were calculated based on the following equations: Butyltin degradation Index (BDI) =  $[MBT] + [DBT] / [TBT]$  and butyltin degradation percentage index ( $\%BT_{s_{deg}}$ ) =  $[1 - (TBT / TBT+DBT+MBT)] \times 100$  (Díez et al. 2006). Old TBT input is normally associated to values of  $BDI > 1$  and  $\% BT_{s_{deg}} > 50\%$  (Díez et al. 2002). Based on that, BDI and  $\% BT_{s_{deg}}$  values for Gulf of Guayaquil indicated aged TBT contributions, since values ranged from 1.8 to 11.2 for BDI and from 64.7 to 91.8 for  $\% BT_{s_{deg}}$  (Table 1). These extremely high indices (11.2 and 91.8%), which reflect the predominance of MBT, were probably due to the strong microbiologic activity produced by the effluent of a big shrimp farming near the sampling site in Balao (Sakami et al. 2008). Additionally, the degradation indices were relatively lower in stations located along the channel of access to Guayaquil harbor (stations S8, S9 and S10), indicating a more recent contribution to these sites. In fact, degradation ratios can be reduced in sites nearby TBT sources (Díez and Bayona 2009). Recent studies for the four southern Brazilian harbors [Paranaguá (Santos et al. 2009) São Francisco do Sul, Imbituba and Itajaí(Oliveira et al. 2010)] have also showed the predominance of DBT and MBT over TBT concentrations (Table 2), which suggest that a natural attenuation combined to a decrease in the input are contributing to sediment remediation in environments in the Atlantic coastal of South America. Since there are not antifouling regulation in Ecuador, those results are probably reflecting the world TBT banning issued by IMO.

## Imposex levels

The current study showed that all areas under the influence of ship or boat traffic presented imposex, which was observed in all of three muricid populations (Table 3). Only La Entrada (S2) and Punta Carnero (S5) did not show any imposex in the studied species. *Thais kiosquiformis*, *Thais brevidentata* and *Thais biserialis* had previously been reported as imposex exhibitors in Panamá (Li and Collin 2009), Costa Rica (Gravel et al. 2006) and India (Ramasamy and Murugan 2002), respectively.

Table 3: Sample size ( $n$ ), male/female proportion ( $\delta/\text{♀}$ ), shell size (mm) and Imposex indices (I%, RPLI, FPLI, VDSI) obtained for *Thais biserialis*, *Thais brevidentata* and *Thais kiosquiformis* collected at different sites of Ecuadorian coastal shore.

Sampled sites	$n$	$\delta/\text{♀}$	Size $\pm$ sd (mm)	I %	RPLI	FPLI $\pm$ sd	VDSI $\pm$ sd
<b>Puerto Lopes (S1)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	30	17/13	19.5 $\pm$ 1.6	31	0.4	0.50 $\pm$ 0.46	0.31 $\pm$ 0.45
<b>La Entrada (S2)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	30	16/14	24.6 $\pm$ 3.1	0.0	0.0	0.00	0.00
<b>Ballenita (S3)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	30	16/14	23.1 $\pm$ 1.9	100	2.8	0.10 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
<b>La Libertad (S4)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	18	8/10	22.4 $\pm$ 2.9	100	1.9	0.10 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
<i>T. biserialis</i>	30	13/17	33.3 $\pm$ 5.8	100	26.1	1.62 $\pm$ 0.72	2.50 $\pm$ 0.52
<b>Punta Carnero (S5)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	30	14/16	17.7 $\pm$ 2.1	0.0	0.0	0.0 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
<b>Chanduy (S6)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	29	9/20	23.3 $\pm$ 1.2	100	1.2	0.07 $\pm$ 0.44	0.75 $\pm$ 0.44
<i>T. biserialis</i>	12	7/5	36.9 $\pm$ 6.1	100	4.0	0.28 $\pm$ 0.44	1.20 $\pm$ 0.40
<b>Playas (S7)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	30	8/22	20.9 $\pm$ 1.9	23	0.4	0.23 $\pm$ 0.43	0.23 $\pm$ 0.43
<b>Posorja (S8)</b>							
<i>T. brevidentata</i>	7	5/2	28.2 $\pm$ 3.9	100	1.5	0.10 $\pm$ na	1.00 $\pm$ na
<i>T. kiosquiformis</i>	30	14/16	41.7 $\pm$ 7.3	100	29.8	2.00 $\pm$ 0.79	3.00 $\pm$ 0.70
<b>Guayaquil harbor 1(S9)</b>							
<i>T. kiosquiformis</i>	30	17/13	47.0 $\pm$ 4.6	100	19.0	2.33 $\pm$ 0.55	3.85 $\pm$ 0.55
<b>Guayaquil harbor 2(S10)</b>							
<i>T. kiosquiformis</i>	30	15/15	46.5 $\pm$ 3.6	100	23.7	2.85 $\pm$ 1.34	3.85 $\pm$ 0.35
<b>Puná (S11)</b>							
<i>T. kiosquiformis</i>	30	13/17	38.7 $\pm$ 4.2	100	29.3	2.05 $\pm$ 0.42	3.00 $\pm$ 0.64
<b>Balao (S12)</b>							
<i>T. kiosquiformis</i>	30	19/11	32.9 $\pm$ 9.7	100	23.5	2.00 $\pm$ 0.44	2.90 $\pm$ 0.70
<b>Bolivar harbor (S13)</b>							
<i>T. kiosquiformis</i>	30	17/13	35.3 $\pm$ 9.0	100	40.7	1.92 $\pm$ 0.77	2.83 $\pm$ 0.57
<b>Jambeli (S14)</b>							
<i>T. kiosquiformis</i>	10	8/2	35.3 $\pm$ 5.7	100	9.0	0.55 $\pm$ na	1.50 $\pm$ na

s.d - Standard deviation

The higher imposex levels were found towards *T. kioquiiformis* inside the Gulf, mainly in areas nearby the Guayaquil and Bolivar harbors. Those two commercial harbors are the largest of Ecuador, being responsible for 65% of all ship traffic in coastal areas of the country (Osorio 2009). Although the Guayaquil harbor (S9 and S10) seem to be busier, the higher BTs concentrations and imposex levels were found in the Bolivar harbor (S13) (Table 1 and 3). That is probably due to local environmental particularities such as a larger residence time of pollutants, since it is a more confined area with no river inputs and under a small tide effect. Additionally, there are many fishing and touristic ships that would be also contributing to TBT inputs.

In the sites S1, S3, S4, S6 and S7, located outside the Gulf of Guayaquil, the imposex was verified in *T. biserialis* and *T. brevidentata*. However, no clear gradient in the imposex levels was detected in the samples collected at different distances of the main harbors, which would be probably related to the presence of small tourist or artisanal fishing harbors in the stations S1, S3, S4 and S6, and to the proximity to the Gulf of Guayaquil (S7). This behavior indicates a diffuse BTs contamination in the coastal areas of Ecuador, something that has been frequently seen in the coastal areas of developing countries (Castro et al. 2008; Castro et al. 2007b; Santos et al. 2009). Some researchers have, in addition, mentioned different intensity in BTs impact produced by commercial, tourist and fishing harbors (Lahbib et al. 2009).

During biomonitoring studies, the use of more than one species to cover wide geographical areas with different habitat types is often necessary (Bech 2002). However, a comparative evaluation about each species' relative sensibility is mandatory to analyze the obtained data. In the present study, two different muricid species were simultaneously sampled at La Libertad (S4), Chanduy (S6) and Posorja (S8). A preliminary appraisal on their relative sensibility was accomplished using RPLI, FPLI



and VDSI levels, assuming these organisms were equally exposed to BTs contamination. The results indicated that *Thais kiosquiformis* is likely to be the most sensitive species to TBT, followed by *Thais biserialis* and *Thais brevidentata* (Figure 2). Considering that an ideal biomonitor must be abundant, with limited mobility, of intertidal and widespread distribution and sensitive to the pollutant (Stewart et al. 1992), *T. kiosquiformis* is probably the best species for future BTs monitoring inside the Gulf of Guayaquil, whereas *T. biserialis* and *T. brevidentata* can be used in the adjacent coastal shore. Although the present results suggested different BTs sensibility among the studied species, it is important to emphasize that those were preliminary data, since it was based on a single analysis and, sometimes, using a reduced number of specimens. Thus, further studies are necessary to better understand the preferential absorption routes and physiological responses of each of those species. Some studies have also reported different levels of response among gastropod species used as bioindicators for organotin contamination. For example, the species *Ocenebrina aciculata*, *Nucella lapillus*, *Ocenebra erinacea*, *Trivia arctica*, *Trivia monacha* and *Hinia reticulata* from the German coast were compared regarding their sensibility to BTs. As a result, *N. lapillus* was found to be the most suitable for TBT contamination in that area (Oehlmann et al. 1996). Similarly, *Thais distinguenda*, *Thais bitubercularis* and *Morula musiva* from Phuket Island (Thailand) were comparatively evaluated, and *T. distinguenda* showed to be the most sensitive species for environmental monitoring of BTs (Bech 1999). On the other hand, a recent comparative study performed with five gastropod species in Lagoon Bizerta (Tunisia) indicated the *Thais* genus as less sensitive to TBT exposure among the muricid species (Lahbib et al. 2010).

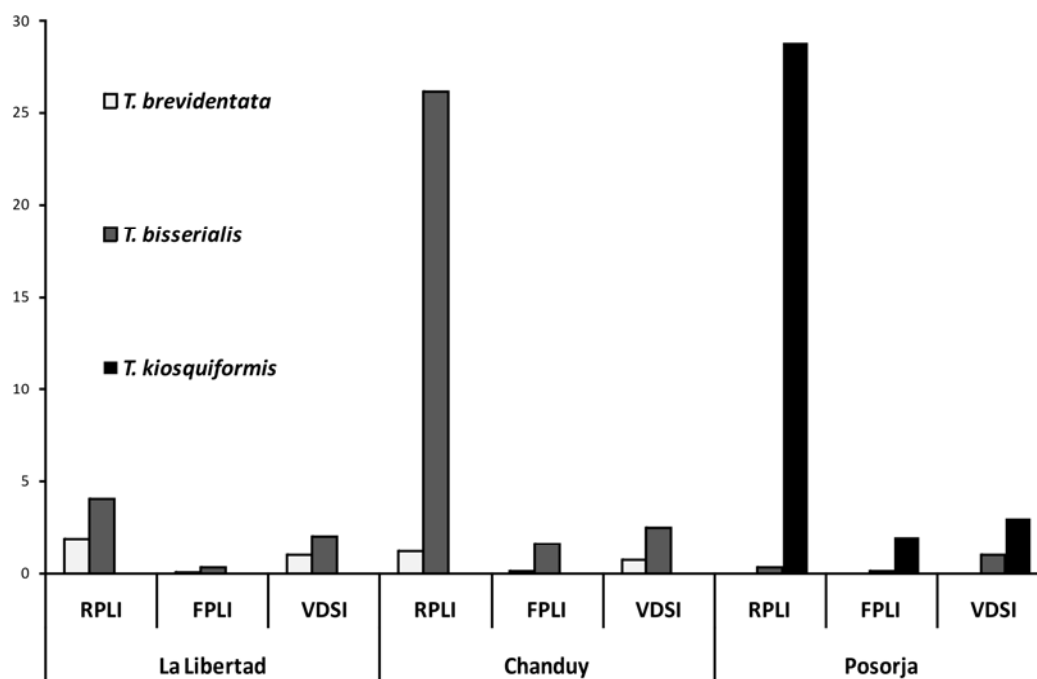


Figure 2: Comparative analysis of imposex indices (RPLI, FPLI and VDSI) on *Thais brevidentata*, *Thais biserialis* and *Thais kiosquiformis*, whenever found in the same site.

#### Data Integration

Although the imposex parameters are more directly related to TBT concentrations in gastropods tissues, several studies have used sediments BTs levels and imposex incidence as a combined environmental approach of organotin contamination (Bigatti et al. 2009; Fernandez et al. 2005). The TBT levels in surface sediments from sites S8, S9, S10, S12, S13 and S14 did not show any relationship with the FPLI ( $r^2 = 0.11$ ,  $p < 0.05$ ) and VDSI ( $r^2 = 0.09$ ,  $p < 0.05$ ) values measured in *T. kiosquiformis*, although the highest imposex indexes were, in general, associated to the areas with the highest TBT contamination. Two hypotheses are proposed to explain the absence of correlation: (1) Inter-individual variability in the penises length of *T. kiosquiformis*, regulated by its reproductive cycle, might affect FPLI and VDSI values, which is not exclusively related to TBT environmental concentrations. Such seasonal variation,

which might led to erroneous interpretation of environmental monitoring data, was previously studied in the muricid *Bolinus brandaris* during an evaluation of imposex in Ria Formosa lagoon (Portugal)(Vasconcelos et al. 2010). (2) The second hypothesis is linked to the global ban on TBT-based antifouling paints. Assuming that imposex might be irreversible, a temporal trend of decreasing of BTs environmental levels may lead to, a mixture of old (imposexed) and young (non- or less-imposexed) females in the same sample, which could cause even large imposex variability. This situation, was already reported by Galante-Oliveira et al.(2009) at Ria Aveiro (Portugal) for the muricid *Nucella lapillus*. Considering the BDI and % BTs<sub>deg</sub> obtained to Gulf of Guayaquil, it is more likely that the absence of correlation with these inter-individual indices was related to a reduction of BTs exposure in recent years, since DBT and MBT have little or no potential to induce imposex in gastropods (Horiguchi et al. 1997). Conversely, TBT concentrations in sediments presented a good correlation with RPLI ( $R^2 = 0.70$ ,  $p < 0.05$ ) in *Thais kiosquiformis*. RPLI is an imposex parameter that roughly balances the sizes of males and females at each site, being less affected by inter-individual variability than VDSI and FPLI (Stroben et al. 1992). Moreover, relative penis indices have been confirmed to be more responsive than VDSI. This stems partially from the use of adult specimens, which are known to be scarcely susceptible to change of VDSI stages (Quintela et al. 2000).

The fate and persistence of TBT, as well as other BTs, in aquatic environments are related to several hydrodynamic and biogeochemical factors (Ruiz et al. 1996). Local circulation and tidal flows usually determine their residence time and, hence, the ultimate loadings (Langston et al. 2009). In addition, due to their physicochemical properties, organotins are predominantly associated with particles, being the adsorption to suspended particulates and subsequent scavenging to sediments an important

transportation and removal process. Therefore, the BTs partitioning will influence their own horizontal and vertical distribution, particularly in turbid estuaries and coastal systems (Fent 2006). Thus, the imposex incidence in *T. biserialis* and *T. brevidentata* in adjacent coastal areas might be also partially explained by TBT associated to particles from Gulf of Guayaquil. Similar findings were reported by Ruiz et al. (2010) showing a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods from Europe, according to this study these field observations are consistent with BT desorption from sediments, a natural phenomenon that is now to be expected in developing countries recently subject to the global TBT ban.

## **Conclusions**

The most BTs contaminated areas were located nearby the main commercial harbors inside the Gulf of Guayaquil, indicating a strong relation with the maritime activities and, probably, antifouling paints used. However, a diffuse BTs impact was also observed along the coastal areas of Ecuador, which is probably related to the presence of small artisanal fishing and touristic harbors.

The degradation indexes and relative levels of BTs suggested an aged input of TBT, which is in accordance with a recent trend of BTs levels reduction due to the global banning, and/or a fast degradation of those compounds in this area. However, imposex was found all over the study area indicating that TBT restriction might not be as effective as expected. The high imposex levels detected in the current study suggest a recent exposition, which can either occur via fresh TBT inputs or from sediments desorption.

The studied muricid populations (*Thais kiosquiformis*, *Thais biserialis* and *Thais brevidentata*) were sensitive to TBT exposure, since different levels of imposex were

detected which, at the same time, probably reflect the correspondent environmental levels of this contaminant. Since *Thais kiosquiformis* followed by *Thais biserialis* seem to be the most sensitive local species, and considering their spatial distribution, this is probably the best association to be used in the future biomonitoring of BTs along the coast of Ecuador.

## Acknowledgments

I. B. de Castro (PhD grant 141550/2007) and G. Fillmann (PQ 311459/2006-4) were sponsored by CNPq (Brazilian National Research Council). The authors are grateful for the Universidade de Guayaquil support. We also wish to thank Msc. René Oscar Rodríguez Grimón for helping during sampling and Instituto Proficere ([www.proficere.com.br](http://www.proficere.com.br)) for the grammatical revision.

## References

- Aguirre WE, Shervette VR (2005) Morphological Diversity of the *Cynoscion* Group (Perciformes: Sciaenidae) in the Gulf of Guayaquil Region, Ecuador: A Comparative Approach. *Environ Biol Fish* 73:403-413
- Almeida AC, Wagener ADR, Maia CB, Miekeley N (2004) Speciation of Organotin Compounds in Sediment Cores From Guanabara Bay, Rio De Janeiro (Brazil) by Gas Chromatography-Pulsed Flame Photometric Detection. *Appl Orgmet Chem* 18:694-704
- Almeida E, Diamantino TC, de Sousa O (2007) Marine Paints: The Particular Case of Antifouling Paints. *Prog Org Coat* 59:2-20
- Bech M (1999) Sensitivity of Different Gastropod to Tributyltin Contamination. *Phu Mar Biol Cent Spc Pub* 19:1-6
- Bech M (2002) A Survey of Imposex in Muricids From 1996 to 2000 and Identification of Optimal Indicators of Tributyltin Contamination Along the East Coast of Phuket Island, Thailand. *Mar Pollut Bull* 44:887-896
- Bigatti G, Primost MA, Cledón M, Averbuj A, Theobald N, Gerwinski W, Arntz W, Morriconi E, Penchaszadeh PE (2009) Biomonitoring of TBT Contamination and Imposex Incidence Along 4700km of Argentinean Shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Mar Pollut Bull* 58:695-701
- Blaber SJM (1970) The Occurrence of a Penis-Like Out Grow Behind the Right Tentacle in Spent Females of *Nucella Lapillus* (L.). *Proc Malacol Soc London* 39:231-233

- Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR (1988) A Comparison of the Effectiveness of Tri-N-Butyltin Chloride and 5 Other Organotin Compounds in Promoting the Development of Imposex in the Dog-Whelk, *Nucella-Lapillus*. *J Mar Biol Ass U K* 68:733-744
- Bryant,D, Rodenbur,E, Cox,T, Nielsen,D. Coastlines at Risk: an Index of Potential Development-Related Threats to Coastal Ecosystems. (1995). Washington, D.C., World Resources Institute. WRI Indicator Brief.
- Castro IB, Bemvenuti CE, Fillmann G (2007a) Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *J Braz Soc Ecotox* 2:73-79
- Castro IB, de Meirelles CAO, Matthews-Cascon H, Rocha-Barreira CD, Penchaszadeh P, Bigatti G (2008) Imposex in Endemic Volutid From Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). *Braz arch biol technol* 51:1065-1069
- Castro IB, Lima AFA, Braga ARC, Rocha-Barreira CA (2007b) Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) From the Northeastern Brazilian Coast. *J Braz Soc Ecotox* 2:81-91
- Castro,IB, Perina,FC, Fillmann,G. Review of organotins contamination in South America. *Environmental Monitoring and Assessment* . (2011).
- Choi M, Moon HB, Yu J, Eom JY, Choi HG (2010) Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels From Busan Harbor of Korea Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Arch Environ Cont Toxicol* 58:394-402
- Clark EL, Sterrit RM, Lester JN (1988) The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment a Look at the Data. *Env Sci Tech* 22:600-604
- Delucchi F, Tombesi NB, Freije RH, Marcovecchio JE (2006) Butyltin Compounds in Sediments of the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Environ Monit Assess* 132:445-451
- Díez S, Abalos M, Bayona JM (2002) Organotin Contamination in Sediments From the Western Mediterranean Enclosures Following 10 Years of TBT Regulation. *Water Res* 36:905-918
- Díez S, Bayona JM (2009) Butyltin Occurrence and Risk Assessment in the Sediments of the Iberian Peninsula. *J Environ Manag* 90:S25-S30
- Díez S, Jover E, Albaiges J, Bayona JM (2006) Occurrence and Degradation of Butyltins and Wastewater Marker Compounds in Sediments From Barcelona Harbor, Spain. *Environ Int* 32:858-865
- Evans SM (1999) Tributyltin Pollution: the Catastrophe That Never Happened. *Mar Pollut Bull* 38:629-636
- Felizzola JF, Wagener AdLR, Almeida AC, Lin WO (2008) Butyltin Speciation in Sediments From Todos Os Santos Bay (Bahia, Brazil) by GC-PFPD. *Quím Nova* 31:89-93
- Fent K (2006) Worldwide Occurrence of Organotins from Antifouling Paints and Effects in the Aquatic Environment, in *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides* (Konstantinou IK ed) pp 71-100, Springer-Verlag, Berlin
- Fernandez MA, Wagener AdLR, Limaverde AM, Scofield AL, Pinheiro FM, Rodrigues E (2005) Imposex and Surface Sediment Speciation: A Combined Approach to Evaluate Organotin Contamination in Guanabara Bay, Rio De Janeiro, Brazil. *Mar Environ Res* 59:435-452
- Galante-Oliveira S, Oliveira I, Jonkers N, Langston WJ, Pacheco M, Barroso CM (2009) Imposex Levels and Tributyltin Pollution in Ria De Aveiro (NW Portugal)

- Between 1997 and 2007: Evaluation of Legislation Effectiveness. *J Environ Monit* 11:1405-1411
- Gibbs PE, Bryan GM (1987) TBT Paints and Demise of the Dog-Whelk *Nucella Lapillus* (Gastropoda). *J Mar Biol Ass U K* 68:1482-1487
- Gibbs PE, Bryan GM, Pascoe PL, Burt GR (1987) The Use of Dog-Whelk *Nucella Lapillus*, As an Indicator of Tributyltin (TBT) Contamination. *J Mar Biol Ass U K* 67:507-523
- Godoi AFL, Montone RC, Santiago-Silva M (2003) Determination of Butyltin Compounds in Surface Sediments From the Sao Paulo State Coast (Brazil) by Gas Chromatography-Pulsed Flame Photometric Detection. *J Chromatogr* 985:205-210
- Gooding M, Gallardo C, LeBlanc G (1999) Imposex in Three Marine Gastropod Species in Chile and Potential Impact on Muriciculture. *Mar Pollut Bull* 38:1227-1231
- Gravel P, Johanning K, McLachlan J, Vargas JA, Oberdorster E (2006) Imposex in the Intertidal Snail *Thais Brevidentata* (Gastropoda : Muricidae) From the Pacific Coast of Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical* 54:21-26
- Gray JS (1981) *The Ecology of Marine Sediments*. Cambridge, University Press, New York.
- Horiguchi T (2009) The Endocrine-Disrupting Effect of Organotin Compounds for Aquatic Organisms, in *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (Arai T, Harino H, Ohji M and Langston WJ eds) pp 125-146, Springer, Tokyo
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Morita M (1997) Effects of Triphenyltin Chloride and Five Other Organotin Compounds on the Development of Imposex in the Rock Shell, *Thais Clavigera*. *Environ Pollut* 95:85-91
- Huaquin LG, Osorio C, Verdugo R, Collado G (2004) Morphological Changes in the Reproductive System of Females *Acanthina Monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda : Muricidae) Affected by Imposex From the Coast of Central Chile. *Invertebr Reprod Dev* 46:111-117
- IMO. Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. <http://www.imo.org/> . (2008). United Kingdom, International Maritime Organization.
- IUPAC (2002) (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 and Applied Chemistry* 74:835-855
- Lahbib Y, Abidli S, Chiffolleau JF, Averty B, El Menif NT (2009) First Record of Butyltin Body Burden and Imposex Status in *Hexaplex Trunculus* (L.) Along the Tunisian Coast. *J Environ Monit* 11:1253-1258
- Lahbib Y, Abidli S, Chiffolleau JF, Averty B, Menif NTE (2010) Imposex and Butyltin Concentrations in Snails From the Lagoon of Bizerta (Northern Tunisia). *Marine Biology Research* 6:600-607
- Langston WJ, Harino H, Pope ND (2009) Behaviour of Organotins in the Coastal Environment, in *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (Arai T, Harino H, Ohji M and Langston WJ eds) pp 75-94, Springer, Tokyo
- Li C, Collin R (2009) Imposex in One of the World's Busiest Shipping Zones. *Smithsonian contributions to the marine sciences* 38:189-196
- Maguire RJ (1984) Butyltin Compounds and Inorganic Tin in Sediments in Ontario. *Env Sci Techol* 18:291-294
- Matthiessen P, Gibbs PE (1998) Critical Appraisal of the Evidence for Tributyltin-Mediated Endocrine Disruption in Mollusks. *Environ Toxicol Chem* 17:37-43

- Miloslavich P, Penchaszadeh PE, Bigatti G (2007) Imposex in Gastropods From Venezuela. *Cienc Mar* 33:319-324
- Mora SJ, Phillips DR (1997) Tributyltin (TBT) Pollution in Riverine Sediments Following a Spill From a Timber Treatment Facility in Henderson, New Zealand. *Environ Technol* 18:1187-1193
- Morabito R, Massanisso P, Quevauviller P (2000) Derivatization Methods for the Determination of Organotin Compounds in Environmental Samples. *TrAC, Trends Anal Chem* 19:113-119
- Oehlmann J, Stroben E, Schulte-Oehlmann U, Bauer B, Fioroni P, Markert B (1996) Tributyltin Biomonitoring Using Prosobranchs As Sentinel Organisms. *Frenesiuss J Anal Chem* 354:540-545
- Oliveira CR, Santos DM, Santos Madureira LA, Marchi MRR (2010) Speciation of Butyltin Derivatives in Surface Sediments of Three Southern Brazilian Harbors. *J Hazard Mater* 181:851-856
- Osorio, MFA. Imposex en Muricideos (Mollusca: Gastropoda) del perfil costero ecuatoriano, una indicación de contaminación por compuestos organoestañosos. - 114. (2009). Universidad de Guayaquil.
- Pinochet H, Tessini C, Bravo M, Quiroz W, De Gregori I (2009) Butyltin Compounds and Their Relation With Organic Matter in Marine Sediments From San Vicente Bay, Chile. *Environ Monit Assess* 155:341-353
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L (2006) Endocrine Disruptors in Marine Organisms: Approaches and Perspectives. *Comp Biochem Physiol , Part C: Toxicol Pharmacol* 143:303-315
- Quintela M, Barreiro R, Ruiz JM (2000) The Use of *Nucella Lapillus* (L.) Transplanted in Cages to Monitor Tributyltin (TBT) Pollution. *Sci Total Environ* 247:227-237
- Ramasamy MS, Murugan A (2002) Imposex in Muricid Gastropod *Thais Biserialis* (Mollusca : Neogastropoda : Muricidae) From Tuticorin Harbour, Southeast Coast of India. *Indian J Mar Sci* 31:243-245
- Ruiz JM, Bachelet G, Caumette P, Donard OFX (1996) Three Decades of Tributyltin in the Coastal Environment With Emphasis on Archacon Bay, France. *Environ Pollut* 93:195-203
- Ruiz JM, Díaz J, Albaina N, Couceiro L, Irabien A, Barreiro R (2010) Decade-Long Monitoring Reveals a Transient Distortion of Baseline Butyltin Bioaccumulation Pattern in Gastropods. *Mar Pollut Bull* 60:931-934
- Sakami T, Fujioka Y, Shimoda T (2008) Comparison of Microbial Community Structures in Intensive and Extensive Shrimp Culture Ponds and a Mangrove Area in Thailand. *Fish Sci* 74:889-898
- Santos DM, Araújo IP, Machado EC, Carvalho-Filho MAS, Fernandez MA, Marchi MRR, Godoi AF (2009) Organotin Compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of Biological Effects, Surface Sediment, and Suspended Particulate Matter. *Mar Pollut Bull* 58:1926-1931
- Shi HH, Huang CJ, Zhu XS, Yu XJ, Xie WY (2005) Generalized System of Imposex and Reproductive Failure in Female Gastropods of Coastal Waters of Mainland China. *Mar Ecol Prog Ser* 304:179-189
- Shim WJ, Oh JR, Kahng SH, Shim JH, Lee SH (1999) Horizontal Distribution of Butyltins in Surface Sediments From an Enclosed Bay System, Korea. *Environ Pollut* 106:351-357
- Sousa A, Laranjeiro F, Takahashi S, Tanabe S, Barroso CM (2009) Imposex and Organotin Prevalence in a European Post-Legislative Scenario: Temporal Trends From 2003 to 2008. *Chemosphere* 77:566-573



- Sternberg R, Gooding M, Hotchkiss A, LeBlanc G (2010) Environmental-Endocrine Control of Reproductive Maturation in Gastropods: Implications for the Mechanism of Tributyltin-Induced Imosex in Prosobranchs. *Ecotoxicology* 19:4-23
- Stewart C, Demora SJ, Jones MRL, Miller MC (1992) Imosex in New-Zealand Neogastropods. *Mar Pollut Bull* 24:204-209
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992) The Morphological Expression of Imosex in *Hinia-Reticulata* (Gastropoda, Buccinidae) - A Potential Indicator of Tributyltin Pollution. *Mar Biol* 113:625-636
- Town RM, Filella M (2002) Implications of Natural Organic Matter Binding Heterogeneity on Understanding Lead(II) Complexation in Aquatic Systems. *Sci Total Environ* 300:143-154
- Vasconcelos P, Gaspar MB, Barroso CM (2010) Imosex in *Bolinus Brandaris* From the Ria Formosa Lagoon (Southern Portugal): Usefulness of "Single-Site Baselines" for Environmental Monitoring. *J Environ Monit*
- Yamamoto J, Yonezawa Y, Nakata K, Horiguchi F (2009) Ecological Risk Assessment of TBT in Ise Bay. *J Environ Manag* 90:S41-S50

## **High TBT and imposex levels in commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas**

Ítalo Braga Castro\* & Gilberto Fillmann

Universidade Federal do Rio Grande, Inst. de Oceanografia, Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO). Rio Grande – RS – Brazil 96201-900 \*Corresponding author: [italobraga@gmail.com](mailto:italobraga@gmail.com)

### **Abstract**

The first appraisal of butyltins (BTs) contamination linked with imposex incidence in Peruvian coastal areas was performed in the current study. Imposex occurrence and BT levels in female bodies were analyzed in *Thais chocolata* distributed along 10 sites in areas under the influence of Callao and Chimbote harbors. Imposex levels associated to high TBT concentrations were observed in 6 out of 10 sites. The highest imposex levels were observed in gastropods collected nearby the harbor terminals. TBT concentrations were the highest reported for gastropod mollusks (up to 662 ng Sn g<sup>-1</sup>) in recent studies. Although the global ban on TBT-based antifouling paints (IMO 2008), the combination of high imposex and TBTs levels with BDI values indicated fresh TBT inputs in these Peruvian coastal areas. Thus, the need for implementation of local regulatory strategies related to the use of antifouling paints is urgent, as well as a thorough assessment on the effectiveness of the TBT global ban. Moreover, the wide distribution of *Thais chocolata* combined with its capability to elicit imposex and bioaccumulate BTs turns this species into a good sentinel for TBT contamination along the South American west coast.

**Keywords:** TBT, *Thais chocolata*, antifouling, organotin, Peru, harbors

## Introduction

Tributyltin (TBT) was used as an active biocide in antifouling paints since the 1960s, but its application has been gradually forbidden in many developed countries since the 1980s. In 2008, a convention issued by the International Maritime Organization (IMO) globally banned TBT-based antifouling paints (Almeida et al., 2007). This compound has been considered one of the most toxic substances and most potent androgenic compounds ever introduced into the marine environments (Sonak et al., 2009). Malformation in oysters (Alzieu, 2000), hormonal imbalance in dolphins (Tanabe, 1999) and imposex in marine gastropods (Smith, 1981) are among the most frequent environmental deleterious effects of TBT, which are directly associated to coastal areas under influence of intense maritime activities as harbors, marinas and shipyards (Lee et al., 2006).

The incidence of imposex, which is defined as a superimposition of male sexual characters such as a penis and a *vas deferens* onto females of gastropods (Gibbs and Bryan, 1987), is claimed to be strictly linked to environmental TBT exposure (Matthiessen and Gibbs, 1998). Almost 200 Prosobranch species have already been reported as imposex exhibitors (Shi et al., 2005; Sternberg et al., 2010). Thus, this biomarker has been efficiently used around the world for the screening of organotin contamination in coastal areas (Sousa et al., 2009).

The main gastropods species used around the world as bioindicators of exposure to organotin contamination are from the Muricidae family (Axiak et al., 2003), such as *Nucella lapillus* (Galante-Oliveira et al., 2010b), *Hexaplex trunculus* (Prime et al., 2006), *Bolinus brandaris* (Vasconcelos et al., 2010), *Stramonita haemastoma* (Castro et al., 2007a) and *Stramonita rustica* (Castro et al., 2007b). Furthermore, muricids are an ecologically relevant family of predatory marine gastropods with relatively large

specimens and commercially fished (Romero et al., 2004). In addition, they have shown to be very sensitivity to TBT exposure (Oehlmann et al., 1996).

Several studies about imposex occurrence and OTs contamination were carried out in Europa, North America, Asia and South America, especially after the international prohibition of TBT usage in antifouling paints (Ruiz et al., 2010). Most of these studies aimed to verify the effectiveness of this global and/or local banishment (i.e. Europa, North America and Asia, where previous data were available) or the current status of OTs contamination (i.e. South American case) (Castro et al., 2011b). However, there are still very few studies reporting the occurrence of imposex (Huaquin et al., 2004; Gooding et al., 1999; Castro et al., 2011a) and only two have quantified butyltin (BTs) levels in surface sediments in the Pacific coast of South America (Pinochet et al., 2009; Castro et al. 2011a). However, no information about imposex or OTs levels is available for the Peruvian coastal areas, which helps to hinder the implementation of local regulatory strategies. Thus, the present study aimed to appraise the current status of imposex and BTs contamination in two of the main harbors areas (Callao and Chimbote) from Peru using *Thais chocolata* as bioindicator. This species is an endemic carnivorous gastropod from the west coast of South America (Chile, Ecuador and Peru) which have been commercially exploited (Arellano and Swartzman ,2010).

## **Materials and Methods**

### **Study area and Samples**

In October 2009, up to 30 adult specimens of *T. chocolata* were collected by scuba diving from 10 sub-tidal sites distributed along areas under the influence of the major commercial and fishing harbors of Peru (Figure 1). Respectively, Callao harbor

(4 sites) is located in the metropolitan area of Lima, whereas Chimbote harbor (6 sites) is situated at 500 km northward of Callao (Figure 1).



Figure 1: Sample sites along the coastal area of Peru under the influence of Callao and Chimbote harbors.

## Imposex determination

The organisms were previously narcotized with a 3.5% MgCl<sub>2</sub> solution for 2 hours. Shells lengths (SL) were then measured with a digital caliper (0.01mm) from the spiral top to lip of siphonal canal. Thus, shells were removed for the analysis of the soft tissues. Gender identification was based on the presence or absence of sexual accessory glands (albumen, capsule and seminal receptacle). The penis length (PL) and the presence of vas deferens in females and males were noted as well.

The imposex levels were assessed using the following indices: % of imposex in females (I%), Female Penis Length index (FPLI= mean penis length of all females in the population, including the zero values), and Relative Penis Length Index (RPLI= [mean penis length in females / mean penis length in males] x 100)(Gibbs et al., 1987). The vas deferens sequence index (VDSI), based on the development of male sexual characters (particularly the vas deferens) by females, was also calculated according Gibbs et al. (1987). Additionally, FPL and RPLI were standardized by the shell lengths (SL) using the following equations (Bigatti, unpublished data):

$$FPL_{stand} = \frac{FPL}{Female\ SL}$$

and

$$RPLI_{stand} = \left[ \frac{\text{mean penis length in females} / \text{mean Female SL}}{\text{mean penis length in males} / \text{mean Male SL}} \right] \times 100$$

## Butyltin analysis

Soft tissues (visceral coils) of 3-5 female gastropods per site were pooled and kept frozen. In the laboratory, samples were freeze dried, ground into powder and kept frozen until chemical analyses. Butyltins (TBT, DBT and MBT) compounds were analyzed according to Castro et al., (2011a). Briefly, an exact amount (~1 g) of freeze dried tissues were placed into 40 mL vials, spiked with 100 ng of Tripropyltin (TPrT) as

surrogate standard. Afterwards, organotins were extracted with 15 mL of 0.05 % tropolone solution (w/v) in methanol and 1 mL of concentrated HCl (37%) in ultrasonic bath by 10 min. The extract volume was reduced to approximately 2 mL and derivatized with 2 mL of pentylmagnesium bromide in diethylether solution (2 M). The excess of Grignard reagent was destroyed by adding 15 mL of ultrapure water and 1 mL of HCl (37%), both previously refrigerated to 4 °C. After derivatization, the pentylated butyltins were recovered by a liquid-liquid extraction with 3 x 5 mL of hexane. Those extracts were evaporated, transferred on top of a silica-gel column and eluted with 15 mL of Hexane/toluene (1:1) mixture. Finally, the solution was concentrated down to 0.9 mL under gently nitrogen flow, and 100 µL of tetrabutyltin solution (1000 ng Sn/mL) was added as internal standard. Extracts were analyzed in a Perkin Elmer Clarus 500MS gas chromatographer equipped with a mass spectrometer detector. The GC was equipped with an Elite-5MS (5 % diphenyl dimethylpolysiloxane) capillary column (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness).

The quality assurance and quality control (QA&QC) was based on regular analyses of blanks and spiked matrices. The samples recoveries were between 98% and 112% and RSD (relative standard deviation) below 20% (IUPAC ,2002). All concentrations were reported as ng Sn g<sup>-1</sup> (dry weight).

#### Statistical analysis

The normality and homogeneity of data (shell lengths (SL), penis lengths (PL), imposex indexes and BTs concentrations) was verified using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. In order to verify whether PL is affected or not by SL in *T. chocolata*, a multiple linear regression between these parameters was performed. Afterwards, a Kruskal-Wallis multicomparative independent test was done for SL from different sites to verify if sizes were different. Spearman non-parametric correlation

analysis was used to investigate the relationship between TBT concentrations in soft tissues and imposex parameters (RPLI<sub>stand</sub>, FPL<sub>stand</sub> and VDSI) among all sites. All statistical analyses were performed using Statistica® (version 6.0 (Statsoft)) with a significant level of 0.05.

## Results and Discussion

### Imposex levels

The biometric data (mean SL, MPL and FPL) and imposex parameters (VDSI, RPLI, FPL<sub>stand</sub> and RPLI<sub>stand</sub>) obtained for *T. chocolata* collected in areas under the influence of Callao and Chimbote harbors are summarized in Table 1. A statistically significant correlation was seen between shell and penis lengths in males ( $r = 0.68$  and  $p > 0.0001$ ) and females ( $r = 0.20$  and  $p > 0.02$ ) of the studied populations, indicating that PL is affected by the SL of *T. chocolata* (Figure 2). However, the low coefficient for females was due to the absence of imposex in organisms collected in areas more distant from harbors. Similar situation was previously reported for the muricid *Bolinus brandaris* from Ria Formosa (Algarve, southern Portugal) (Vasconcelos et al., 2011). According to this study, the assessment of imposex spatial variations should include robust and reliable indices, such as VDSI and/or standardized RPLI and FPL. This approach was employed successfully in organotin monitoring studies using imposex incidence in gastropods from the Patagonian coast (Bigatti, unpublished data). Thus, FPL and RPLI values were standardized to reduce bias due to significant variations (Kruskal Wallis;  $p < 0.0001$ ) detected among shell lengths from organisms of the present study.



Table 1: Shell lengths (SL), Male and Female Penis lengths (MPL and FPL), relative penis length index (RPLI), Vas deferens sequence index (VDSI), and RPLI and FPL standardized by SL (RPLI<sub>stand</sub> and FPL<sub>stand</sub>) measured in *Thais chocolata* from areas under the influence of two Peruvian harbors. (sd) standard deviation, (n) number of analyzed specimens.

Harbor / Site	$n \text{ ♂}$	SL ♂ ± sd	$n \text{ ♀}$	SL ♀ ± sd	MPL ± sd	FPL ± sd	RPLI	VDSI ± sd	FPL <sub>stand</sub>	RPLI <sub>stand</sub>	I %	
		(mm)		(mm)	(mm)	(mm)						
Callao	Ca1	14	61.3 ± 4.9	16	58.3 ± 4.5	20.1 ± 3.2	13.6 ± 2.5	67.7	4.0 ± 0.0	0.23	71.1	100.0
	Ca2	11	53.2 ± 5.7	13	54.6 ± 11.7	14.3 ± 4.7	8.1 ± 2.8	56.6	4.0 ± 0.0	0.15	55.2	100.0
	Ca3	14	67.7 ± 3.7	16	70.7 ± 5.1	18.0 ± 2.5	0.0 ± 0.0	0.0	0.0 ± 0.0	0.00	0.0	0.0
	Ca4	15	54.2 ± 9.9	15	54.7 ± 7.3	8.3 ± 4.5	0.0 ± 0.0	0.0	0.0 ± 0.0	0.00	0.0	0.0
Chimbote	Ch1	15	46.4 ± 5.1	15	48.5 ± 5.4	8.9 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.0	0.6 ± 0.5	0.00	0.0	40.0
	Ch2	14	45.9 ± 5.2	15	48.2 ± 4.5	12.2 ± 1.7	4.8 ± 1.4	39.3	3.6 ± 0.5	0.10	37.5	100.0
	Ch3	11	46.0 ± 4.1	19	46.2 ± 5.0	10.2 ± 1.6	0.3 ± 0.3	2.9	2.9 ± 0.2	0.01	2.9	47.4
	Ch4	9	44.3 ± 3.7	21	43.9 ± 3.1	9.0 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0	0.0 ± 0.0	0.00	0.0	0.0
	Ch5	14	50.7 ± 7.3	16	49.1 ± 8.2	11.0 ± 3.5	1.6 ± 2.6	14.5	1.3 ± 1.4	0.03	15.0	100.0
	Ch6	16	51.9 ± 6.0	14	52.6 ± 6.9	15.6 ± 2.6	10.1 ± 3.3	64.7	4.0 ± 0.0	0.19	63.9	100.0

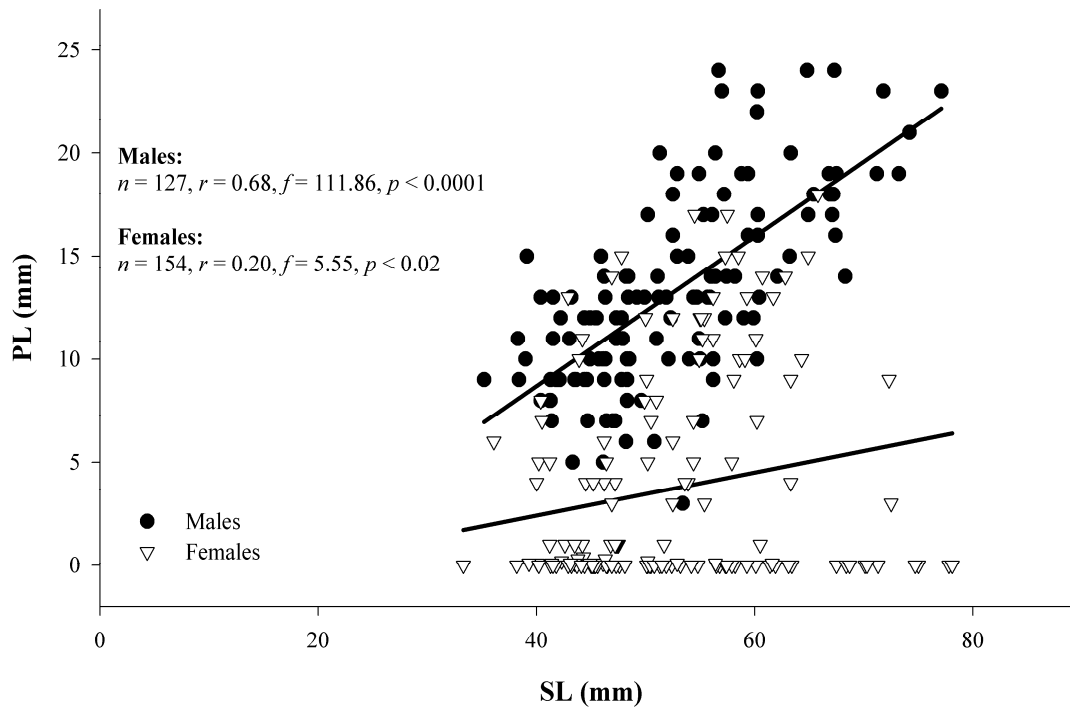


Figure 2: Correlation analyses between SL and PL in *Thais chocolata* from Peru

To our concern this is the first report of imposex to *T. chocolata*, which was detected in 6 out of 10 sites. Two of the highest imposex levels were observed in stations Ca1 (VDSI = 4.0,  $FPL_{stand} = 0.23$  and  $RPLI_{stand} = 71.1$ ) and Ca2 (VDSI = 4.0,  $FPL_{stand} = 0.15$  and  $RPLI_{stand} = 55.2$ ), which were located nearby the access channel to Callao commercial harbor (Table 1 and Figure 1). In addition, four sterile females (VDSI = V) were detected at Ca1 station. High imposex levels were also verified at sites Ch6 (VDSI = 4.0,  $FPL_{stand} = 0.19$  and  $RPLI_{stand} = 63.9$ ) and Ch2 (VDSI = 3.6,  $FPL_{stand} = 0.10$  and  $RPLI_{stand} = 37.5$ ), located nearby the harbor facilities at Chimbote bay (Table 1 and Figure 1). On contrary, no imposex signs were detected at sites Ca3 and Ca4, and Ch1 and Ch4, located further away from Callao harbor and Chimbote fishing harbor, respectively. This clear gradient in the imposex incidence indicates that TBT sources were indeed related to ship and/or boat activities. Similar results have been frequently reported in several coastal worldwide areas, always pointing out harbors

areas as hotspots of TBT contamination (i.e. northern Argentinean Patagonia (Penchaszadeh et al., 2009); Ecuador coast (Castro et al. 2011a), Johor Straits Malaysia (Cob et al., 2010); Portuguese coast (Sousa et al. 2009); US Virgin Islands from Caribbean Sea (Strand et al., 2009); southeastern Chinese coast (Huang et al., 2008); among others).

#### Butyltin Contamination

Tributyltin predominated over DBT and MBT for all samples from both studied areas. Levels ranged from 23.5 to 662.6 ng Sn g<sup>-1</sup> dry wt, whereas DBT and MBT levels ranged from < LOD to 161.5 and < LOD to 186.2 ng Sn g<sup>-1</sup> dry wt, respectively (Table 2). As previously seen for the imposex data, the highest OT concentrations were also found nearby the harbors (Figure 1). In fact, these TBT levels were among the highest reported in recent studies for gastropods (Table 3). In addition, these high TBT concentrations are particularly worrying since *T. chocolata* is, along with other mollusks, commercially exploited by artisanal and commercial fisheries. Besides, many of these fisheries are conducted in coastal areas nearby harbors (Arellano and Swartzman ,2010). Although the present analyses were run in visceral coil tissues, and the edible tissue is the foot muscle which is normally relatively less contaminated (Okoro et al., 2011), a health risks assessment regarding the ingestion of TBT from sea food should be done with the general population and fishermen from the Peruvian coastal areas. Other coastal areas have also shown concern with the same matter (i.e. Thailand (Swennen et al., 2009): Taiwan (Chien et al., 2002)).

Table 2: Butyltin concentrations (ng Sn g<sup>-1</sup> dry wt) and BDI in soft tissues of female *Thais chocolata* from areas under the influence of two Peruvian harbors. < LOD (below limit of detection)

Harbor	Site	TBT	DBT	MBT	∑BTs	BDI
Callao	Ca1	662.6	161.5	119.0	943.1	0.42
	Ca2	319.0	153.0	186.2	658.2	1.06
	Ca3	24.5	<LOQ	<LOQ	24.5	0.00
	Ca4	61.6	<LOQ	3.0	64.6	0.05
Chimbote	Ch1	117.1	<LOQ	3.0	120.1	0.03
	Ch2	356.8	37.6	28.1	422.5	0.18
	Ch3	138.6	53.2	49.8	241.6	0.74
	Ch4	23.5	<LOQ	<LOQ	23.5	0.00
	Ch5	88.3	<LOQ	13.0	101.3	0.15
	Ch6	363.5	77.2	76.3	517.0	0.42

Table 3: TBT concentrations and total butyltins ( $\sum$ BTs) (ng Sn g<sup>-1</sup> dw) obtained for several gastropod species from other worldwide studies.

Locality	year	Specie	TBT	$\sum$ BTs	reference
Bizerta Channel, Tunisian coast	2007	<i>Hexaplex trunculus</i>	23.9	47.4	(Abidli et al., 2009)
Lagoon of Bizerta, Tunisian coast	2007	<i>Bolinus brandaris</i>	12.8	39.0	(Abidli et al. 2010)
Kong Kong Laut, Malaysia	2007	<i>Thais gradata</i>	769*	1590*	(Mohamat-Yusuff et al., 2010)
Ria de Aveiro, Portugal	2006	<i>Nucella lapillus</i>	134	na	(Galante-Oliveira et al., 2009)
Basque Country, Spain	2007	<i>Nassarius reticulatus</i>	405	na	(Rodríguez et al. 2009)
Viana Castelo: Estaleiro, Portugal	2008		380	780	(Sousa et al. 2009)
US Virgin Islands	2007	<i>Thais deltoidea</i>	101	241	(Strand et al. 2009)
Mirs Bay, China	2006	<i>Thais clavigera</i>	41.9	122.4	(Chan et al., 2008)
Callao Harbor (Peru)	2009	<i>Thais chocolata</i>	662.6	943.1	<b>Present study</b>
Chimbote Harbor (Peru)	2009		363.5	517	

\* wet weight / na: data not available

Although butyltin degradation index ( $BDI = [MBT + DBT] / TBT$ ) has been firstly proposed for sediment studies (Díez et al., 2002), it has been recently used in mollusc tissues to predict TBT exposition time (Sousa et al. 2009; Ruiz et al., 2008). BDI values indicated that fresh TBT inputs are still occurring in the Peruvian coastal areas (Table 2). Although the mechanisms of TBT degradation are still unknown for *T. chocolata* and TBT desorption from sediments may also contribute, the high levels and the predominance of TBT clearly indicate new inputs. However, complementary studies related to BTs levels in the sediment and physiological processes involved are essential for a better understanding the exposure mechanisms of TBT to *T. chocolata*.

#### Data Integration

Highly significant correlations were found between TBT concentrations in soft tissues of *T. chocolata* females and VDSI ( $r = 0.94$   $p < 0.001$ ),  $FPL_{stand}$  ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.001$ ) and  $RPLI_{stand}$  ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.001$ ), confirming that this ecotoxicological response is directly related to the extension of TBT contamination. Similar findings have been reported for other gastropods such as *Nassarius reticulatus* (Rodríguez et al., 2009), *Bolinus brandaris* (Abidli et al., 2010), *Hexaplex trunculus* (Lahbib et al., 2009), *Nucella lapillus* (Smith et al., 2006), among others. In fact, VDSI is pointed out as the most responsive to BTs contamination among those indexes, providing a direct indication of the reproductive capacity of the females in the population (Vasconcelos et al. 2011).

In muricid species like *Nucella lapillus*, the BTs accumulation occurs preferentially via food and also water. Considering that *T. chocolata* is a subtidal carnivorous muricid that lives over hard substrates (feeding mainly on mussels and barnacles that, ultimately, accumulate from the water column) and is ecologically similar to *N. lapillus*, its apparent high capacity to bioaccumulate BTs may reflect the

contamination predominantly from the water column (Galante-Oliveira et al., 2010a; Stroben et al., 1992; Bryan et al., 1993). Although difficult to estimate, the high levels of TBT detected could also be related to indirect sources, such as desorption from contaminated sediments (Ruiz et al. 2010). In any case, despite the fact that inputs and metabolic routes are still unclear, these strong and significant correlations between imposex indexes and BTs concentrations suggest that *T. chocolata* is a good indicator of organotin contamination and could be used as a monitor for future studies in Peruvian coastal areas.

Callao is the most important and busier Peruvian harbor. In addition, there is a marina for leisure boats nearby the main harbor area (Figure 1). All this maritime traffic is responsible for the high imposex and TBT levels detected at the harbor access channel (Ca1) and at the marina (Ca2). Similarly, the most contaminated sites at Chimbote bay were located nearby a big fishing harbor (Ch6) and in the north entrance of the bay (Ch2) (Figure 1). Despite located in a more enclosed bay, the intensity and distance from specific sources of organotins and the local circulation patterns at Chimbote bay might explain some inconsistencies, where imposex and TBT levels were lower at site Ch5 than Ch2, located further away from the harbor area. Since the circulation in the Chimbote bay transport waters preferentially towards the northern entrance (Dios and Zorilla, unpublished data), all contamination released into the bay could be transported towards the site Ch2, explaining the high levels of TBT and imposex in this site.

Considering that Peru has no antifouling legislation in force (Castro et al. 2011b), it is very likely that TBT-based antifouling paints are still being used, which would explain the high imposex and BTs levels detected in *T. chocolata* along the Peruvian coastal areas. These fresh TBT inputs are an indication that the global ban is

not being effective in Peru, differently to what is being seen for many coastal areas along Europe (Gipperth ,2009;Sousa et al. 2009), Asia (Choi et al., 2010), Africa (Lahbib et al. 2009), North America (Wade et al., 2008) and South America (Castro et al. 2011a;Oliveira et al., 2010), where environmental inputs of TBT are gradually decreasing.

## **Conclusions**

Imposex levels associated to high TBT concentrations were observed in *T. chocolata* from areas under direct influence of Callao and Chimbote harbors. In fact, TBT concentrations were the highest reported for gastropod mollusks (up to 662 ng Sn g<sup>-1</sup> dry wt) in recent studies. Although the global ban on TBT-based antifouling paints, the combination of high imposex and TBTs levels with BDI values indicates fresh TBT inputs in these Peruvian coastal areas. Thus, the need for implementation of local regulatory strategies related to the use of antifouling paints is urgent, as well as a thorough assessment on the effectiveness of the TBT global ban. Moreover, the wide distribution of *Thais chocolata* combined with its capability to elicit imposex and bioaccumulate BTs turns this species into a good sentinel for TBT contamination along the South American west coast.

## **Acknowledgments**

I.B. de Castro (PhD grant 141550/2007) and G. Fillmann (PQ 311459/2006-4 and 314335/2009-9) were sponsored by CNPq (Brazilian National Research Council).



## References

- Abidli, S., Lahbib, Y., El Menif, N.T., 2009. Effects of TBT on the imposex development, reproduction and mortality in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). *J.Mar.Biol.Ass.U.K.* 89, 139-146.
- Abidli, S., Lahbib, Y., Trigui El Menif, N., 2010. Imposex and butyltin concentrations in *Bolinus brandaris*; (Gastropoda: Muricidae) from the northern Tunisian coast. *Environ.Monit.Assess.* 1-10.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog.Org.Coat.* 59, 2-20.
- Alzieu, C., 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci.Total Environ.* 258, 99-102.
- Arellano, C.E., Swartzman, G., 2010. The Peruvian artisanal fishery: Changes in patterns and distribution over time. *Fish.Res.* 101, 133-145.
- Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A., Mintoff, B., 2003. Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environ.Int.* 28, 743-749.
- Bryan, G.W., Bright, D.A., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 1993. Uptake, Tissue Distribution and Metabolism of C-14-Labeled Tributyltin (Tbt) in the Dog-Whelk, *Nucella lapillus*. *J.Mar.Biol.Ass.U.K.* 73, 889-912.
- Castro, I.B., Bemvenuti, C.E., Fillmann, G., 2007a. Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *J.Braz.Soc.Ecotox.* 2, 73-79.
- Castro, I.B., Lima, A.F.A., Braga, A.R.C., Rocha-Barreira, C.A., 2007b. Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. *J.Braz.Soc.Ecotox.* 2, 81-91.
- Castro, Í., Arroyo, M., Costa, P., Fillmann, G., 2011a. Butyltin Compounds and Imposex Levels in Ecuador. *Arch.Environ.Cont.Toxicol.* 1-10.
- Castro, Í., Perina, F., Fillmann, G., 2011b. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environ.Monit.Assess.* 1-19.
- Chan, K.M., Leung, K.M.Y., Cheung, K.C., Wong, M.H., Qiu, J.W., 2008. Seasonal changes in imposex and tissue burden of butyltin compounds in *Thais clavigera* populations along the coastal area of Mirs Bay, China. *Mar.Pollut.Bull.* 57, 645-651.

- Chien, L.C., Hung, T.C., Choang, K.Y., Yeh, C.Y., Meng, P.J., Shieh, M.J., Han, B.C., 2002. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *The Science of The Total Environment* 285, 177-185.
- Choi, M., Moon, H.B., Yu, J., Eom, J.Y., Choi, H.G., 2010. Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels from Busan Harbor of Korea Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 58, 394-402.
- Cob, Z., Arshad, A., Bujang, J., Ghaffar, M., 2010. Description and evaluation of imposex in *Strombus canarium* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Strombidae): a potential bio-indicator of tributyltin pollution. *Environ. Monit. Assess.* 1-8.
- Díez, S., Abalos, M., Bayona, J.M., 2002. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Res.* 36, 905-918.
- Galante-Oliveira, S., Oliveira, I., Jonkers, N., Langston, W.J., Pacheco, M., Barroso, C.M., 2009. Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: evaluation of legislation effectiveness. *J. Environ. Monit.* 11, 1405-1411.
- Galante-Oliveira, S., Oliveira, I., Pacheco, M., Barroso, C.M., 2010a. *Hydrobia ulvae* imposex levels at Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1998 and 2007: a counter-current bioindicator? *J. Environ. Monit.* 12, 500-507.
- Galante-Oliveira, S., Oliveira, I., Santos, J.A., de Lourdes Pereira, M., Pacheco, M., Barroso, C.M., 2010b. Factors affecting RPSI in imposex monitoring studies using *Nucella lapillus* (L.) as bioindicator. *J. Environ. Monit.* 12, 1055-1063.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.M., 1987. TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 68, 1482-1487.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.M., Pascoe, P.L., Burt, G.R., 1987. The use of dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 67, 507-523.
- Gipperth, L., 2009. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. *J. Environ. Manag.* 90, S86-S95.
- Gooding, M., Gallardo, C., LeBlanc, G., 1999. Imposex in Three Marine Gastropod Species in Chile and Potential Impact on Muriciculture. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 1227-1231.
- Huang, C.J., Zhu, S.X., Lin, J.D., Dong, Q.X., 2008. Imposex of *Mauritia arabica* on the south-eastern coast of China. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 88, 1451-1457.
- Huaquin, L.G., Osorio, C., Verdugo, R., Collado, G., 2004. Morphological changes in the reproductive system of females *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda : Muricidae) affected by imposex from the coast of central Chile. *Invertebr. Reprod. Dev.* 46, 111-117.

IUPAC, 2002. (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 and Applied Chemistry* 74, 835-855.

Lahbib, Y., Abidli, S., Chiffolleau, J.F., Averty, B., El Menif, N.T., 2009. First record of butyltin body burden and imposex status in *Hexaplex trunculus* (L.) along the Tunisian coast. *J. Environ. Monit.* 11, 1253-1258.

Lee, C.C., Hsieh, C.Y., Tien, C.J., 2006. Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments, and their potential health risk. *Chemosphere* 65, 547-559.

Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37-43.

Mohamat-Yusuff, F., Zulkifli, S., Ismail, A., Harino, H., Yusoff, M., Arai, T., 2010. Imposex in *Thais gradata* as a Biomarker for TBT Contamination on the Southern Coast of Peninsular Malaysia. *Water, Air, & Soil Pollution* 211, 443-457.

Oehlmann, J., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, U., Bauer, B., Fioroni, P., Markert, B., 1996. Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 540-545.

Okoro, H.K., Fatoki, O.S., Adekola, F.A., Ximba, B.J., Snyman, R.G., Opeolu, B., 2011. Human Exposure, Biomarkers, and Fate of Organotins in the Environment. in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 213, 213 ed. Springer New York, pp. 27-54.

Oliveira, C.R., Santos, D.M., Santos Madureira, L.A., Marchi, M.R.R., 2010. Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. *J. Hazard. Mater.* 181, 851-856.

Penchaszadeh, P., Antelo, C., Zabala, S., Bigatti, G., 2009. Reproduction and imposex in the edible snail *Adelomelon ancilla* from northern Patagonia, Argentina. *Mar. Biol.* 156, 1929-1939.

Pinochet, H., Tessini, C., Bravo, M., Quiroz, W., De Gregori, I., 2009. Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay, Chile. *Environ. Monit. Assess.* 155, 341-353.

Prime, M., Peharda, M., Jelic, K., Mladineo, I., Richardson, C.A., 2006. The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 810-812.

Rodríguez, J.G., Tueros, I., Borja, A., Franco, J., Ignacio, G.A.J., Garmendia, J.M., Muxika, I., Sariego, C., Valencia, V., 2009. Butyltin compounds, sterility and imposex assessment in *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), prior to the 2008 European ban on TBT antifouling paints, within Basque ports and along coastal areas. *Cont. Shelf Res.* 29, 1165-1173.

- Romero, M.S., Gallardo, C.S., Bellolio, G., 2004. Egg laying and embryonic-larval development in the snail *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832) with observations on its evolutionary relationships within the Muricidae. *Mar.Biol.* 145, 681-692.
- Ruiz, J.M., Barreiro, R., Couceiro, L., Quintela, M., 2008. Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. *Chemosphere* 73, 1253-1257.
- Ruiz, J.M., Díaz, J., Albaina, N., Couceiro, L., Irabien, A., Barreiro, R., 2010. Decade-long monitoring reveals a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods. *Mar.Pollut.Bull.* 60, 931-934.
- Shi, H.H., Huang, C.J., Zhu, X.S., Yu, X.J., Xie, W.Y., 2005. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 304, 179-189.
- Smith, A.J., Thain, J.E., Barry, J., 2006. Exploring the use of caged *Nucella lapillus* to monitor changes to TBT hotspot areas: A trial in the River Tyne estuary (UK). *Mar.Environ.Res.* 62, 149-163.
- Smith, B.S., 1981. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *J.Appl.Toxicol.* 1, 141-144.
- Sonak, S., Pangam, P., Giriyan, A., Hawaldar, K., 2009. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. *J.Environ.Manag.* 90, S96-S108.
- Sousa, A., Laranjeiro, F., Takahashi, S., Tanabe, S., Barroso, C.M., 2009. Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* 77, 566-573.
- Sternberg, R., Gooding, M., Hotchkiss, A., LeBlanc, G., 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19, 4-23.
- Strand, J., Jørgensen, A., Tairova, Z., 2009. TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea. *Environ.Int.* 35, 707-711.
- Stroben, E., Oehlmann, J., Fioroni, P., 1992. *Hinia-Reticulata* and *Nucella-Lapillus* - Comparison of 2 Gastropod Tributyltin Bioindicators. *Mar.Biol.* 114, 289-296.
- Swennen, C., Sampantarak, U., Ruttanadakul, N., 2009. TBT-pollution in the Gulf of Thailand: A re-inspection of imposex incidence after 10 years. *Mar.Pollut.Bull.* 58, 526-532.
- Tanabe, S., 1999. Butyltin Contamination in Marine Mammals - A Review. *Mar.Pollut.Bull.* 39, 62-72.
- Vasconcelos, P., Gaspar, M.B., Barroso, C.M., 2010. Imposex in *Bolinus brandaris* from the Ria formosa lagoon (southern Portugal): usefulness of "single-site baselines" for environmental monitoring. *J.Environ.Monit.*

Vasconcelos, P., Moura, P., Barroso, C., Gaspar, M., 2011. Size matters: importance of penis length variation on reproduction studies and imposex monitoring in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). *Hydrobiologia* 661, 363-375.

Wade, T.L., Sweet, S.T., Klein, A.G., 2008. Assessment of sediment contamination in Casco Bay, Maine, USA. *Environ.Pollut.* 152, 505-521.

## **CAPÍTULO V - Redução dos níveis de imposex no Sul do Brasil**

No presente capítulo, os níveis de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* oriundas de áreas sob a influência dos principais terminais portuários do Sul do Brasil foram comparados antes e após do banimento global do TBT. Adicionalmente, foram determinadas as concentrações de butilestânicos nos organismos utilizados. O artigo científico resultante desse estudo encontra-se aceito para publicação em um número especial sobre a América Latina do periódico “*Environmental Toxicology and Chemistry*”, sob o título “*Imposex reduction and reminiscent butyltin contamination in Southern Brazilian harbors*”.

## **Imposex reduction and reminiscent butyltin contamination in Southern Brazilian harbors**

Ítalo Braga Castro, Martina Rossato & Gilberto Fillmann

Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 96201-900, Brazil. Tel.: + 55 53 3233-6866; fax.: +55 53 3233-6738, e-mail: gfillmann@furg.br

### **Abstract**

The imposex incidence was appraised in South American gastropods considering the scenario before and after the global ban of TBT. A statistically significant reduction on imposex indexes was observed in *Stramonita haemastoma* collected in 2006 and 2010 from areas under the influence of four coastal harbors from Southern Brazil. This reduction is probably due to the effectiveness of the global ban issued by IMO, although the ineffectual restrictions on TBT-based antifouling paints in Brazil may also have helped somehow. Even so, a reminiscent organotin contamination was still detected in female tissues (levels ranged from 7.6 to 164.9 ng Sn/g, < 2 to 214.5 ng Sn/g, < 3.5 to 178.8 ng Sn/g and < 1.5 to 53 ng Sn/g for TBT, DBT, MBT and TPT, respectively). Thus, although a reduction in imposex and OTs environmental levels is expected in every ocean around the world soon after the implementation of national and international restriction regulations, this will depend on: (1) the effectiveness of global TBT ban, (2) the effectiveness of local restrictions on production, sale and use of TBT-based antifouling paints and (3) specific characteristics of local sediments, since metabolization rates and sorption/desorption of TBT previously deposited might affect its environmental bioavailability. Therefore, the reduction trend detected in the current study cannot be extrapolated for other Brazilian or South American coastal areas.

**Keywords:** imposex, reduction, Southern Brazilian, organotin, temporal trend

## Introduction

Imposex was firstly reported as a sexual aberration in the early 1970's. Blaber[1] had described it for *Nucella lapillus* from Plymouth (United Kingdom) and Smith[2] for *Ilyanassa obsoleta* from Southport and Westport (USA). However, its cause-effect relationship with organotins (OTs) exposure was only discovered in 1981[3]. Thereafter, imposex has been used as a powerful biomarker to map coastal areas impacted by organotins [4]. Currently, the imposex is a widespread problem, affecting more than 200 worldwide species of Caenogastropoda [5-7].

Tributyltin (TBT)-based antifouling paints have been used since the 1970's in solid surfaces directly exposed to sea water (e.g. ship hulls, aquaculture nets, offshore structures, buoys and ducts) to avoid undesirable accumulation of marine organisms (*fouling*).[8,9] Meanwhile, several environmental deleterious effects have been related to their application, such as oysters malformation [10], immunosuppression in dolphins [11], immunotoxicity in fish [12], imposex, decline of gastropod populations [13] and metabolic disruption in fish [14]. Hence, in the early 1980's, many countries have started to adopted restrictive regulations on the use of TBT-based marine coatings on ships less than 25 m long. However, since shipping is a worldwide activity, controls on antifouling systems by individual countries were not effective enough to prevented contamination, even in their own territorial sea. Therefore, a global prohibition of TBT-based antifouling paints was proposed by International Maritime Organization (IMO) entering into force definitively at September 2008 [15].

Recovery of gastropod populations previously affected by imposex had been reported following the restrictive regulations toward TBT use on marine protective coatings. For example, a significant imposex reduction was verified for populations of *Nucella lapillus* [16] and *Nassarius reticulatus* [17] after the European legislation had



banned the use of TBT-based antifouling paints. In Africa, imposex recovery was detected between 2004 and 2007 in *Hexaplex trunculus* from Tunisian coast [18]; and a re-inspection in the imposex incidence 10 years after local restrictions of TBT use showed a decrease values in *Thais orbita* from Australia [19]. Concerning OTs environmental concentrations, many studies have also recently detected a reduction of levels in Asia [20], Europe [21] and North America [22]. However, no information regarding the effectiveness of TBT global ban in South America is available in the literature.

For this reason, areas under the influence of four of the main harbors from the southern coast of Brazil were assessed in 2010 for imposex occurrence and OTs levels in *Stramonita haemastoma* and compared with a previous study that reported imposex for the very same species and areas before the TBT global ban [23]. The harbor terminals of Paranaguá (Paraná state), São Francisco do Sul (Santa Catarina state), Itajaí (Santa Catarina state) and Rio Grande (Rio Grande do Sul state) are among the largest and busiest in southern Brazilian coast.

## **Materials and Methods**

### **Sampling**

Up to 30 adult specimens of *S. haemastoma* were caught (either manually or by free diving) in February 2010 in 17 sampling sites located in areas under the influence of four main harbors of southern Brazil (Paranaguá harbor in Paranaguá bay, São Francisco do Sul harbor in Babitonga bay, Itajaí harbor in Itajaí Acú river estuary and Rio Grande harbor in Patos lagoon estuary) (Figure 1). These sites were exactly the same of those previously collected in February 2006 by Castro and co-workers [23].

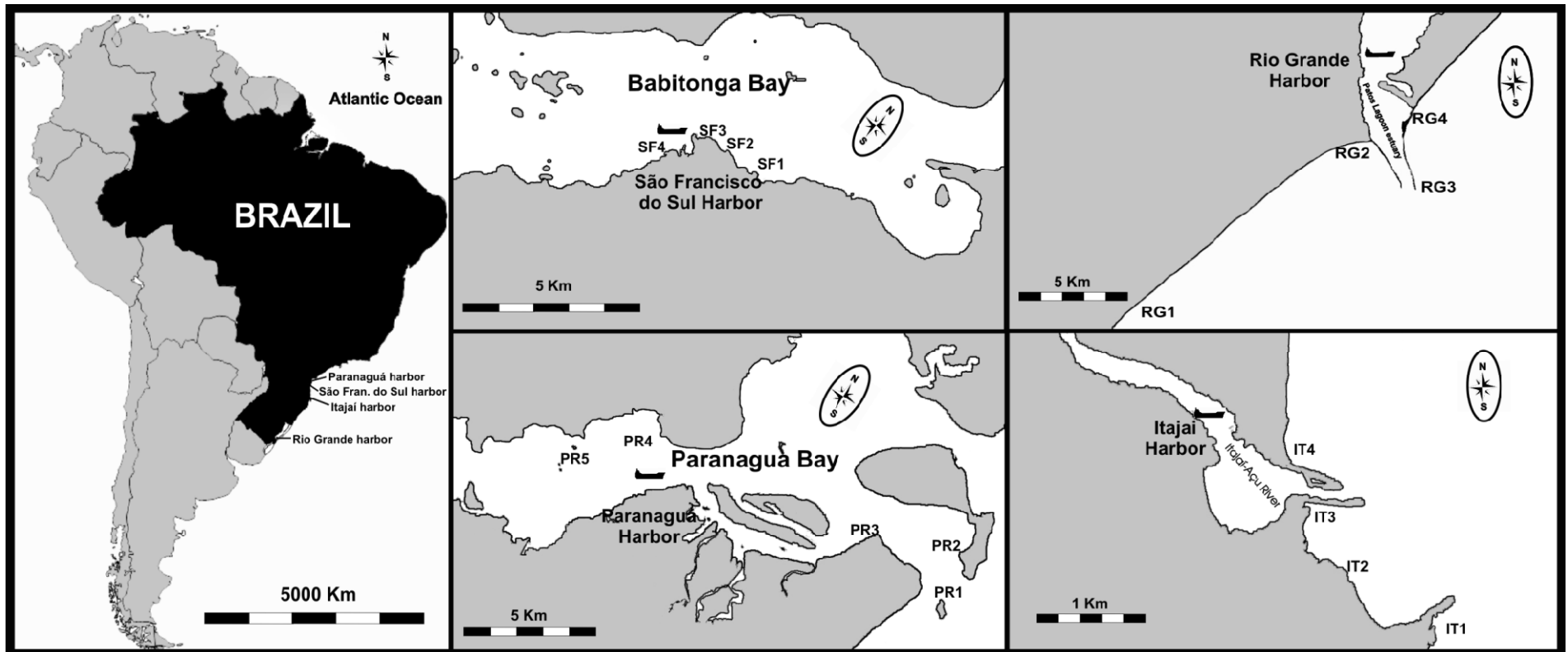


Figure 1: Sampling sites at southern Brazilian harbors.

## Imposex determination

The organisms were narcotized with a 3.5% MgCl<sub>2</sub> solution for a period of 2 hours before the analysis. Shells were measured with a digital caliper (0.01mm) from the apex to lip of siphonal canal. Thus, shells were removed for the analysis of the soft tissues. Gender identification was based on the presence or absence of sexual accessory glands (albumen, capsule and seminal receptacle). The penis length and the presence of vas deferens in females and males were recorded at the same time.

The imposex levels were assessed using the following indices: (a) % of imposex in females (I %), (b) Female Penis Length index (FPL= mean penis length of all females in the population, including the zero values), (c) Relative Penis Length Index (RPLI= [mean penis length in females / mean penis length in males] x 100)[24] and the (d) vas deferens sequence index (VDSI), based on the development of male sexual characters (particularly the vas deferens) by females, was calculated according Fernandez *et al.* [25].

## Female OTs body burdens

Chemical analyses were performed in whole visceral coil tissues pooled from 7 to 15 females collected from each site in 2010. Soft tissues were freeze dried after imposex determinations, grounded into powder and kept at -20 °C in dark conditions. Organotins (TBT, dibutyltin (DBT), monobutyltin (MBT) and triphenyltin (TPT) levels were analyzed following the procedure described by Castro *et al.* (*submitted*). Briefly, an exact amount (~1 g) of freeze dried tissues were placed into 40 mL vials, spiked with 100 ng of Tripropyltin (TPrT) as surrogate standard. Afterwards, organotins were extracted with 15 mL of 0.05 % tropolone solution (w/v) in methanol and 1 mL of concentrated HCl (37%) in ultrasonic bath by 10 min. The extract volume was reduced

to approximately 2 mL and derivatized with 2 mL of pentylmagnesium bromide in diethylether solution (2 M). The excess of Grignard reagent was destroyed by adding 15 mL of ultrapure water and 1 mL of HCl (37%), both previously refrigerated to 4 °C. After derivatization, the pentylated butyltins were recovered by a liquid-liquid extraction with 3 x 5 mL of hexane. Those extracts were evaporated, transferred on top of a silica-gel column and eluted with 15 mL of Hexane/toluene (1:1) mixture. Finally, the solution was concentrated down to 0.9 mL under gently nitrogen flow, and 100 µL of tetrabutyltin solution (1000 ng Sn/mL) was added as internal standard. Extracts were analyzed in a Perkin Elmer Clarus 500MS gas chromatographer equipped with a mass spectrometer detector. The GC was equipped with an Elite-5MS (5 % diphenyl dimethylpolysiloxane) capillary column (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness).

The quality assurance and quality control (QA&QC) was based on regular analyses of blanks and spiked matrices. The samples recoveries were between 70% and 109% and RSD (relative standard deviation) below 20%.[26] All concentrations were reported as ng Sn/g (dry weight) and quantification limits were 1.0, 2.0, 3.5 and 1.5 ng Sn/g to TBT, DBT, MBT and TPT, respectively.

#### Statistical analysis

Normality and homogeneity of shell lengths, imposex parameters and BTs concentrations data was verified by Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. A multiple linear regression was performed to verify if male shell lengths have a significant effect on male penis lengths. Afterwards the differences between shell length measured in males and females during 2006 and 2010 were evaluated by Mann-Whitney U-test.

Three different statistical approaches were used to assessing the changes of imposex levels between 2006 and 2010. Firstly, a combined analyzes using non-

parametric Wilcoxon signed rank test was performed pooling all 17 sites together to verify temporal differences in VDSI and FPL. In the second and third approaches, Mann-Whitney U-test was applied to assess differences between VDS and FPL individual values at each site and by sampling area, respectively.

Spearman non-parametric correlation analysis was accomplished to investigate the relationship between TBT concentrations in female soft tissues and imposex levels (RPLI, FPLI and VDSI) during the campaign of 2010. All statistic analyzes were performed by software Statistica® (version 6.0 (Statsoft)) with a significance level of 0.05.

## **Results**

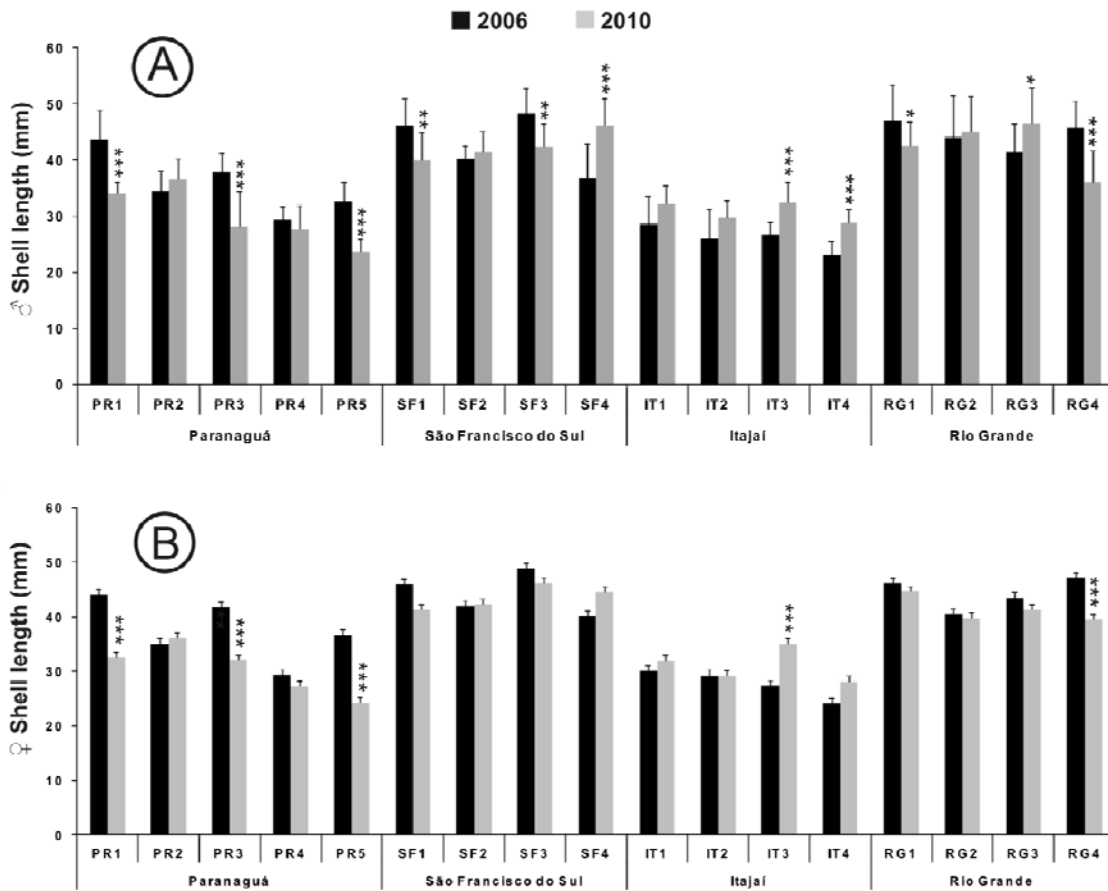
### **Imposex Determination**

The Imposex parameters, mainly RPLI, are frequently influenced by animal sizes, even when the sample is composed only by adult animals [27]. For males of *S. haemastoma*, the multiple linear regressions showed that shell size was significantly related to the square root of penis length ( $t = 6.568, p < 0.0001$ ). Although the range seem similar between the two sampling campaigns (23.1 to 48.3 mm in 2006 and 23.5 to 46.5 mm in 2010) (Table 1), 11 out of 17 sites showed statistically different male shell lengths (Figure 2A). For these reasons, the significance in the reduction of RPLI results observed for 13 studied sites was not statistically tested (Table 1). In females, the shell lengths were significantly smaller in 4 sites only (PR1, PR3, PR5 and RG4) (Figure 2B). In this case, smaller female shell (probably indicating younger organisms) could be responsible for an underestimation of VDSI, FPL (Figure 3) and I% (Table 1).

Table 1: Mean ( $\pm$ standard deviation) shell length (mm) and imposex levels obtained for *Stramonita haemastoma* in 2006 and 2010. sd - standard deviation, *n* - number of analyzed specimens, I % - imposex frequency, VDSI - vas deferens sequence index, FPL - average of female penis length and RPLI - relative penis length index.

Site	Shell length ♂ (mm) $\pm$ sd ( <i>n</i> )		Shell length ♀ (mm) $\pm$ sd ( <i>n</i> )		I %		VDSI $\pm$ sd		FPL $\pm$ sd		RPLI	
	2006	2010	2006	2010	2006	2010	2006	2010	2006	2010	2006	2010
PR1	43.7 $\pm$ 5.2 (14)	33.9 $\pm$ 2.2 (16)	44.1 $\pm$ 5.7 (16)	32.5 $\pm$ 2.4 (14)	35.7	42.8	0.36 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.11	0.52	0.62
PR2	34.3 $\pm$ 3.7 (15)	36.6 $\pm$ 3.7 (15)	35.1 $\pm$ 3.2 (15)	36.1 $\pm$ 4.8 (15)	100.0	73.3	1.00 $\pm$ 0.00	0.73 $\pm$ 0.50	0.10 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.03	0.98	0.93
PR3	37.8 $\pm$ 3.4 (12)	28.2 $\pm$ 6.1 (15)	41.7 $\pm$ 8.2 (12)	32.1 $\pm$ 7.5 (12)	100.0	93.3	1.92 $\pm$ 0.80	0.93 $\pm$ 0.32	0.93 $\pm$ 0.80	0.09 $\pm$ 0.02	12.81	1.57
PR4	29.3 $\pm$ 2.4 (7)	27.7 $\pm$ 4.1 (8)	29.4 $\pm$ 1.7 (16)	27.3 $\pm$ 2.2 (7)	85.3	37.5	1.14 $\pm$ 0.70	0.37 $\pm$ 0.50	0.34 $\pm$ 0.50	0.04 $\pm$ 0.13	16.93	0.65
PR5	32.6 $\pm$ 3.5 (14)	23.5 $\pm$ 2.4 (12)	36.7 $\pm$ 4.3 (16)	24.2 $\pm$ 1.9 (14)	87.7	83.3	0.86 $\pm$ 0.40	0.83 $\pm$ 0.40	0.86 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.00	1.44	1.44
SF1	46.0 $\pm$ 4.9 (21)	40.0 $\pm$ 5.0 (16)	46.0 $\pm$ 6.9 (8)	41.4 $\pm$ 5.1 (14)	100.0	100.0	3.44 $\pm$ 0.40	1.00 $\pm$ 0.00	3.10 $\pm$ 1.60	0.10 $\pm$ 0.03	25.92	0.88
SF2	48.3 $\pm$ 4.5 (12)	42.4 $\pm$ 4.1 (13)	48.8 $\pm$ 5.7 (10)	46.2 $\pm$ 4.4 (17)	100.0	94.0	4.85 $\pm$ 0.70	1.31 $\pm$ 0.41	5.70 $\pm$ 1.00	1.03 $\pm$ 0.40	65.00	2.99
SF3	40.2 $\pm$ 2.3 (19)	41.5 $\pm$ 3.6 (10)	42.0 $\pm$ 7.1 (11)	42.3 $\pm$ 5.6 (20)	100.0	81.2	2.41 $\pm$ 0.40	0.81 $\pm$ 0.50	1.70 $\pm$ 1.00	0.12 $\pm$ 0.21	17.37	0.49
SF4	36.9 $\pm$ 6.0 (13)	46.1 $\pm$ 5.0 (14)	40.1 $\pm$ 5.5 (17)	44.6 $\pm$ 6.3 (9)	100.0	100.0	4.17 $\pm$ 0.70	1.00 $\pm$ 0.50	4.50 $\pm$ 1.10	0.08 $\pm$ 0.02	54.52	0.65
IT1	28.5 $\pm$ 5.1 (12)	32.1 $\pm$ 3.4 (13)	30.1 $\pm$ 4.5 (18)	32.0 $\pm$ 2.3 (17)	0.0	0.0	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00	0.00
IT2	26.0 $\pm$ 5.3 (15)	29.8 $\pm$ 3.0 (16)	29.3 $\pm$ 4.1 (15)	29.2 $\pm$ 1.5 (14)	0.0	0.0	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00	0.00
IT3	26.7 $\pm$ 2.3 (10)	32.5 $\pm$ 3.5 (10)	27.4 $\pm$ 4.0 (14)	35.1 $\pm$ 3.6 (20)	100.0	0.0	1.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.04	0.00 $\pm$ 0.00	3.80	0.00
IT4	23.1 $\pm$ 2.5 (14)	28.8 $\pm$ 2.4 (15)	24.1 $\pm$ 2.2 (16)	28.2 $\pm$ 2.7 (15)	100.0	0.0	1.14 $\pm$ 0.40	0.00 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00	1.80	0.00
RG1	47.0 $\pm$ 6.4 (17)	42.5 $\pm$ 4.8 (14)	46.1 $\pm$ 9.4 (11)	44.7 $\pm$ 5.7 (16)	18.2	0.0	0.20 $\pm$ 0.40	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	0.15	0.00
RG2	44.1 $\pm$ 7.3 (18)	45.1 $\pm$ 6.2 (13)	40.5 $\pm$ 4.2 (12)	39.8 $\pm$ 4.3 (17)	58.3	0.0	0.60 $\pm$ 0.50	0.00 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	0.64	0.00
RG3	41.4 $\pm$ 5.8 (11)	46.5 $\pm$ 6.4 (15)	43.5 $\pm$ 5.7 (19)	41.4 $\pm$ 4.6 (15)	15.8	0.0	0.15 $\pm$ 0.50	0.00 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	0.11	0.00
RG4	45.8 $\pm$ 4.7 (11)	41.0 $\pm$ 5.7 (13)	47.1 $\pm$ 4.3 (19)	39.5 $\pm$ 4.1 (16)	53.1	0.0	0.63 $\pm$ 0.40	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00	0.58	0.00

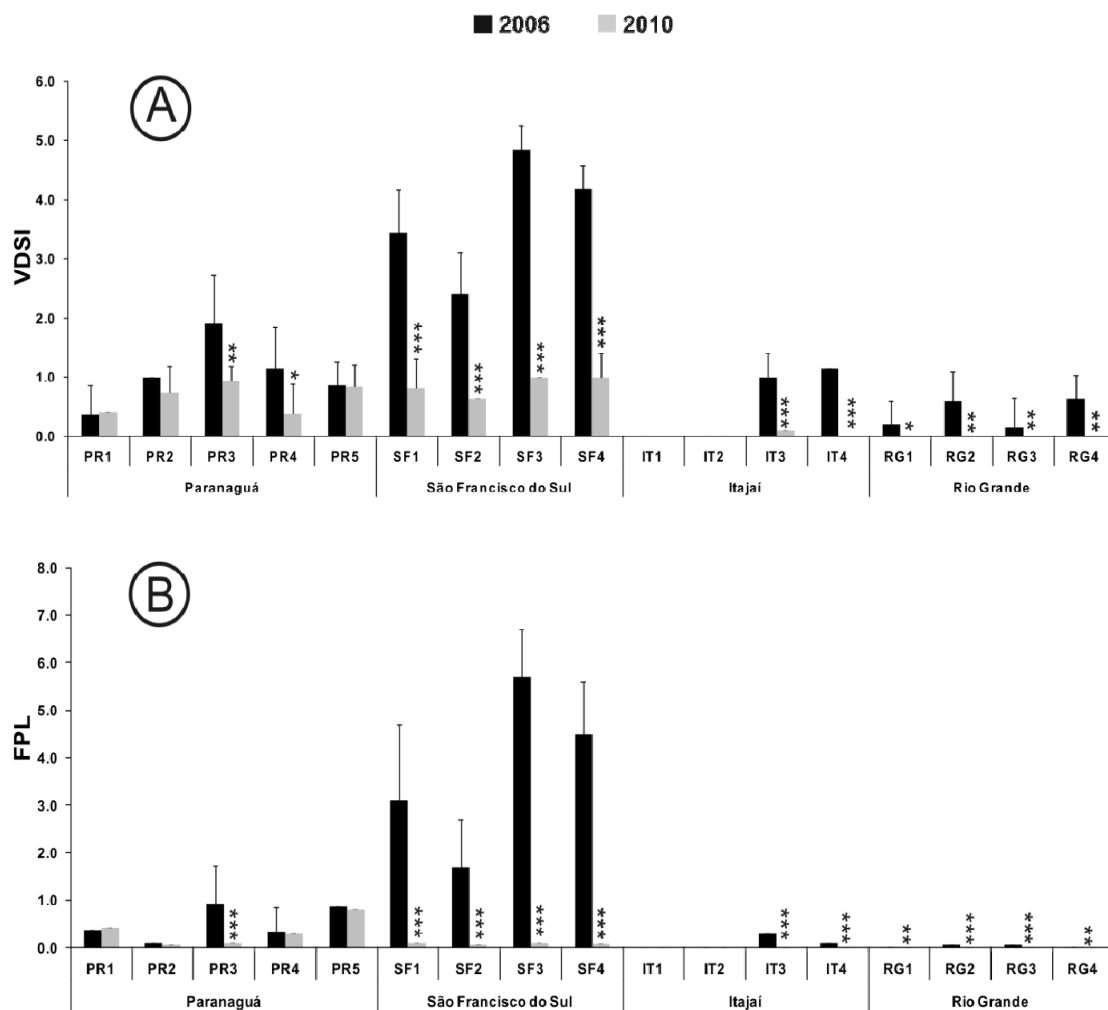
Figure 2: Comparison of mean ( $\pm$ standard deviation) shells length (mm) for males (A) and females (B) collected in 2006 and 2010. Significant differences are marked (\* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  and \*\*\* -  $p < 0.001$ ).



Considering the whole trend (all sites together), the reduction in VDSI and FPL values (Table 1) was statistically significant according to Wilcoxon signed rank test ( $w = -120$ ,  $p = 0.0006$  and  $w = -109$ ,  $p = 0.001$ , respectively). Assessing by locality, VDSI and FPL decreases were extremely significant at São Francisco do Sul bay, Itajaí harbor area and Rio Grande harbor area ( $p < 0.0001$ ), whereas no significant differences were observed for VDSI at Paranaguá bay. Only 3 sites (PR1, PR2 and PR5) previously impacted by imposex did not show any reduction in the VDSI values. The stations IT1 and IT2 (Itajaí harbor area) did not show any imposex in both 2006 and 2010 campaigns (Table 1). In fact, the stations SF1, SF2, SF3, SF4, IT3 and IT4 presented a more

pronounced decrease (Mann-Whitney U-test,  $p < 0.001$ ), although the sites PR3, RG2, RG3 ( $p < 0.01$ ) and PR4, RG1 and RG4 ( $p < 0.05$ ) have also shown significant reductions in VDSI values (Figure 3a). Similarly, a pronounced reduction in FPL values was seen for the same sites (Figure 3b). However, VDSI and FPL values might have been underestimated at PR3 and RG4 in 2010 since female sizes at these sites were significantly lower than 2006. Sterile females were observed for stations SF3 (80%) and SF4 (17.6%) in 2006, but no longer in the sampling campaign of 2010.

Figure 3: Comparisons of mean ( $\pm$ standard deviation) VDSI (A) and FPL (B) values obtained for 2006 and 2010. Significant differences are marked (\* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  and \*\*\* -  $p < 0.001$ ).





Although I% was not statistically compared due to the existence of a single value per site, a decrease trend in 12 out of 17 studied sites was in accordance with the reductions detected for VDSI and FPL.

#### Female OTs body burdens

Organotin compounds were detected in all tissue samples from 2010 (Table 2). TBT was the predominant OT in almost all sites (except  $\leq 20\%$  of  $\Sigma$ OTs for PR2, SF4, IT2 and RG1), ranging from 7.6 to 164.9 ng Sn/g. The DBT levels ranged between  $< 2.0$  and 214.5 ng Sn/g, whereas MBT residues ranged between  $< 3.5$  and 178.8 ng Sn/g. Triphenyltin was also detected with concentrations ranging between  $< 1.0$  and 53.0 ng Sn/g.

Table 2: Concentrations (ng Sn/g dw) and percentage of organotin compounds in *S. haemastoma* female tissues collected in 2010.  $< \text{LOD}$  - below limit of detection.

Site	Site Code	TBT	DBT	MBT	TPT	BDI	$\Sigma$ OTs	(%)			
								TBT	DBT	MBT	TPT
Paranaguá bay	PR1	62.3	23.0	6.0	0.0	0.5	91.3	68.2	25.2	6.6	0.0
	PR2	52.6	214.5	$< \text{LOD}$	4.6	4.1	271.7	19.4	78.9	0.0	1.7
	PR3	49.2	$< \text{LOD}$	$< \text{LOD}$	9.5	0.0	58.7	83.8	0.0	0.0	16.2
	PR4	49.0	$< \text{LOD}$	8.4	$< \text{LOD}$	0.2	57.4	85.4	0.0	14.6	0.0
	PR5	58.5	50.1	$< \text{LOD}$	6.5	0.9	115.1	50.8	43.5	0.0	5.6
Babitonga bay	SF1	64.2	52.6	28.2	10.8	1.3	155.8	41.2	33.8	18.1	6.9
	SF2	164.9	45.8	83.5	19.4	0.8	313.6	52.6	14.6	26.6	6.2
	SF3	51.2	38.4	18.1	17.9	1.1	125.6	40.8	30.6	14.4	14.3
	SF4	30.5	83.5	19.4	10.3	3.4	143.7	21.2	58.1	13.5	7.2
Itajaí harbor	IT1	10.4	2.6	$< \text{LOD}$	$< \text{LOD}$	0.3	13.0	80.0	20.0	0.0	0.0
	IT2	15.6	6.9	12.5	53.0	1.2	88.0	17.7	7.8	14.2	60.2
	IT3	32.5	$< \text{LOD}$	6.8	$< \text{LOD}$	0.2	39.3	82.7	0.0	17.3	0.0
	IT4	30.4	$< \text{LOD}$	$< \text{LOD}$	$< \text{LOD}$	0.0	30.4	100.0	0.0	0.0	0.0
Rio Grande harbor	RG1	54.6	69.2	178.8	6.4	4.5	309.0	17.7	22.4	57.9	2.1
	RG2	12.5	6.8	5.7	8.5	1.0	33.5	37.3	20.3	17.0	25.4
	RG3	9.7	7.3	$< \text{LOD}$	4.6	0.8	21.6	44.9	33.8	0.0	21.3
	RG4	7.6	5.2	$< \text{LOD}$	3.1	0.7	15.9	47.8	32.7	0.0	19.5

The butyltin degradation index ( $BDI = (MBT+DBT)/TBT$ ) was calculated following Díez et al.[28]. Although this index was firstly developed for sediments, it has been recently used for mollusks tissues to predict exposition time ( $BDI < 1$  corresponds to recent BTs contamination) [17,21]. BDI values varied between 0 and 4.1 (mean = 1.1) for Paranaguá bay, 0.8 and 3.4 (mean = 1.6) for Babbitonga bay, 0 and 1.2 (mean= 0.4) for Itajaí harbor area and 0.7 and 4.5 (mean = 1.7) for Rio Grande harbor area.

## **Discussion**

Reductions in the imposex levels have been reported worldwide [16,17,29]. However, temporal studies of imposex parameters are frequently affected by animal biometric variations [16,30]. Thus, some precautions were taken to minimize misinterpretations in the trends of imposex levels of the present study. Firstly, the sampling was conducted in the same month to avoid seasonal variability in the penises length, which is regulated by reproductive cycle of *S. haemastoma*. This problem was previously reported in *Bolinus brandaris* and may affect FPL and VDSI values [31]. In addition, only adult animals (>20 mm) were collected and the same method was used for imposex determination allowing a consistent data interpretation. In addition, RPLI is an imposex parameter that roughly balances the sizes of males and females at each sample, consequently it is less affected by inter-individual variabilities than VDSI and FPL [32]. Nevertheless, considering that high variations in animal sizes were observed in the present study (mainly for males), the use of RPLI might introduce additional bias in the trend analyze. A similar situation was observed for *Hidrobia ulvae* during a temporal trend study at Rio Aveiro (Portugal) [27]. In this case the RPLI data was not used in the statistical analyses.

Even considering these limitations in the interpretation, the results have clearly demonstrated a reduction in the imposex data for all areas under the influence of the

four main harbors from southern Brazil. In addition, the highest OTs concentrations and imposex levels were detected in coastal areas under the influence of São Francisco do Sul (SF1, SF2, SF3 and SF4) and Paranaguá (PR1, PR2, PR3, PR4 and PR5) harbors, whereas OTs were proportionally lower in sites with low imposex incidence. Therefore, significant correlations were found between TBT concentrations in females tissues and VDSI ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.001$ ), FPL ( $r = 0.80$ ,  $p = 0.0002$ ) and RPLI ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.001$ ). These relationships were previously seen for other gastropod species such as *Nassarius reticulatus* [17], *Hexaplex trunculus* [18], *N. lapillus* [33]. Although TPhT can also induce imposex in *S. haemastoma* under laboratory conditions [34] the low detected concentrations usually recorded in the environment and present study probably plays only a negligible role in promoting the development of imposex in natural populations [35].

Concerning the four studied areas, Paranaguá bay, located at the Paranaguá estuarine complex, has two large commercial harbors (Paranaguá and Antonina) and several marinas. Considering all of its sites a significant VDSI reduction was seen in Paranaguá bay between 2006 and 2010. Even so, the TBT levels and BDI values in *S. haemastoma* tissues indicated a fresh exposure to organotin, since TBT predominated in most of those samples. However, levels were not so high comparable to heavily contaminated site [17,36]. Since *S. haemastoma* feed on filter feeders organisms, its levels might reflect an accumulation from the water column (dissolved + suspended matter). These results agreed with Santos et al. [37] and Santos (personal communication) that detected high but reducing levels of OTs in sediment samples collected from Paranaguá bay in 2006 and 2009. Levels of MBT and DBT in these studies predominated over TBT in almost all sites suggesting a reduction on recent TBT inputs or a fast environmental degradation rates. These results corroborate with the

reduction trend of imposex observed in the present study, since DBT and MBT have less or no potential to induce imposex [38].

The most expressive imposex reduction occurred in the areas under the influence of São Francisco do Sul harbor, since all stations in Babitonga bay showed high significant decreases of imposex parameters. Although TBT levels ranged between 30 and 165 ng Sn/g, BDI values ( $\geq 1$ ) indicated some reduction in fresh inputs. Oliveira et al.[39] have also detected OTs in 3 out of 5 sediment samples collected inside the Babitonga bay in October 2007. Despite the TBT levels, some BDI values also indicated a reduction in fresh inputs. Therefore, the observed imposex reductions are in accordance with the relative predominance of OTs in sediments obtained by Oliveira et al.[39], indicating that attenuation is contributing to environmental remediation in Babitonga bay.

Itajaí harbor is located inside the Itajaí-Açu river, a predominantly mesohalinic environment. Thus, the biological monitoring was done in the adjacent coastal areas, since *S. haemastoma* does not occur near the harbor. Although 2 out of 4 sites have not shown imposex in both occasions (IT1 and IT2), it was possible to detect a statistically significant imposex reduction in two sites (IT3 and IT4). Despite that, the obtained BDI mean in *S. haemastoma* tissues from Itajaí harbor suggested that fresh TBT inputs or exposition (although low) were still occurring in these areas. However, Oliveira et al.[39] have reported high TBT levels, with BDI values also indicating fresh TBT inputs, for several sediment samples collected inside the estuarine area in July 2008. The only site located in the coastal area (the nearest from biological monitoring) showed much lower BTs contamination and BDI values  $\gg 1$ .

Similarly, the biomonitoring of Rio Grande harbor area was conducted with samples collected in the adjacent coastal areas, since no gastropods were found inside

the Patos Lagoon estuary (low salinities). Although VDSI and FPL obtained for site RG4 in 2010 may be affected by female shell length, results showed a significant reduction in the imposex levels for all stations. However, BDI values suggested some fresh (although low) inputs of TBT to *S. haemastoma* from Patos Lagoon adjacent coastal areas. On the other hand, relatively low BTs levels and high BDI values were found for sediments from Rio Grande harbor area (I.B. Castro, personal data), which support the hypothesis that inputs of TBT have been gradually reduced in the area.

Despite this clear trend of reduction in imposex for those areas, a reminiscent OTs contamination was detected in mollusks from these areas and a predominance of TBT was still evident. Since previous studies in sediments of these areas indicated a possible reduction on “fresh” TBT inputs (metabolites predominated over parental BT) [37,39], a limited metabolic ability of *S. haemastoma* to degrade TBT could explain its predominance. However, new inputs of TBT either from sediment desorption or direct use cannot be ruled out. *S. haemastoma* is a carnivorous muricid inhabitant of hard substrates,[40] that probably accumulates TBT preferentially via food (mainly mussels and barnacles) and also from water. The OTs metabolism in *S. haemastoma* as well as bioaccumulation factors is still unknown. However, bioconcentration factors for phylogenetically related muricid species, such as *Thais clavigera* and *N. lapillus*, were about 5,000 – 10,000 and 29,000, respectively [41,42]. In addition, the TBT biological half-life was estimated at 22 days for *T. clavigera* [41]. Assuming a similar OTs behavior for all muricid species, it is likely that TBT levels detected in *S. haemastoma* in the current study could be due to recent (although most of the time low) environmental TBT exposition and/or its limited degradation capacity. Ruiz and coworkers [43] reveals a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods from Europe. These field observations are consistent with BT

desorption from sediments, a natural phenomenon that expected in developing countries recently subject to the global TBT ban. Although there are no times series for BTs contamination in these studied areas, this could be an explanation for the BT levels found in current study.

Relatively relevant TBT levels were also found in non imposexed females from Itajaí and Rio Grande. This could be due to differential sensibility among analyzed populations, since they were geographically isolated from each other. A similar situation was already reported for *Thais distinguenda* from Puket island [44]. Additionally, an unpublished experimental study done with *S. haemastoma* showed that exposure (water and injection) to high TBT concentrations was not able to induce imposex in organisms collected from RG1. Thus, further investigation is needed to elucidate possible differences in sensibility among distinct populations of *S. haemastoma* previously exposed to impacted areas in comparison to those from clean areas.

The use of organotin-based antifouling paints was forbidden in Brazil from November 2007 by means of NORMAN-23/DPC [45]. These regulation established inspections and registration standards for all antifouling systems, as well as management of their residues [45]. In addition, although the global prohibition of these products entered into force in September of 2008, several local legislations also imposed restrictions (e.g. European countries [17]). Thus, a reduction in imposex and OTs environmental levels is expected in every ocean around the world soon after the implementation of national and international restriction regulations. However, the speed and effectiveness of this reducing trend will depend on: (1) the effectiveness of global TBT ban, which affects all regions evenly since is directly related to the international marine traffic; (2) the effectiveness of local restrictions on production, sale and use of

TBT-based antifouling paints, which may differ among countries and regions inside each country. Even with its use forbidden, many countries (such as Brazil) do not regulate production and sale, and also have a feeble control on its use, and (3) specific characteristics of local sediments, since degradation rates and sorption/desorption of TBT previously deposited might affect its environmental bioavailability. Therefore, is difficult to predict when and where such a reduction will occur. Although the current detected decline of imposex incidence in *S. haemastoma* from southern Brazilian harbors is the first report of imposex recovery in South America, a comparative study performed in 2001 and 2008 at Arraial do Cabo - Rio de Janeiro state (southeastern Brazil) showed a spatial increase in imposex occurrence[46]. Thus, due to the scarcity of special and temporal trend studies, and lack of or inexpressive legislation and use control, the reduction trend detected in the current study cannot be extrapolated for other Brazilian or South American coastal areas, since the local oceanographic characteristics and use of TBT-based antifouling paints are probably more relevant than international restrictions on their use.

#### Acknowledgments

I. B. de Castro (PhD grant 141550/2007) and G. Fillmann (PQ 311459/2006-4 and 314335/2009-9) were sponsored by CNPq (Brazilian National Research Council). The authors are also grateful to Centro de Estudos do Mar (Federal University of Paraná) for helping during sampling.

## References

1. Blaber SJM. 1970. The occurrence of a penis-like out grow behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proc Malacol Soc London* 39:231-233.
2. Smith BS. 1971. Sexuality in the American mud-snail *Nassarius obsoletus* Say. *Proc Malacol Soc London* 39:377-378.
3. Smith BS. 1981. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *J Appl Toxicol* 1:141-144.
4. Minchin D, Stroben E, Oehlmann J, Bauer B, Duggan CB, Keatinge M. 1996. Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Mar Pollut Bull* 32:188-195.
5. Shi HH, Huang CJ, Zhu XS, Yu XJ, Xie WY. 2005. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Mar Ecol Prog Ser* 304:179-189.
6. Sternberg R, Gooding M, Hotchkiss A, LeBlanc G. 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19:4-23.
7. Castro Í, Perina F, Fillmann G. 2011. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environ Monit Assess* 1-19.
8. Champ MA. 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci Total Environ* 258:21-71.
9. Kotrikla A. 2009. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *J Environ Manag* 90:S77-S85.
10. Alzieu C. 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci Total Environ* 258:99-102.
11. Yang J, Miyazaki N, Kunito T, Tanabe S. 2006. Trace elements and butyltins in a Dall's porpoise (*Phocoenoides dalli*) from the Sanriku coast of Japan. *Chemosphere* 63:449-457.
12. Nakayama A, Segner H, Kawai S. 2009. Immunotoxic Effects of Organotin Compounds in Teleost Fish. In Arai T, Harino H, Ohji M, Langston WJ, eds, *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*, Springer, Tokyo, pp 207-218.  
Ref Type: Book Chapter
13. Horiguchi T, Kojima M, Hamada F, Kajikawa A, Shiraishi H, Morita M, Shimizu M. 2006. Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations. *Environ Health Perspect* 114:13-19.
14. Meador JP, Sommers FC, Cooper KA, Yanagida G. 2011. Tributyltin and the obesogen metabolic syndrome in a salmonid. *Environ Res* 111:50-56.



15. Senda T. 2009. International Trends in Regulatory Aspects. In Arai T, Harino H, Ohji M, Langston WJ, eds, *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*, Tokyo, pp 23-34.  
Ref Type: Book Chapter
16. Morton B. 2009. Recovery from imposex by a population of the dogwhelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda: Caenogastropoda), on the southeastern coast of England since May 2004: A 52-month study. *Mar Pollut Bull* 58:1530-1538.
17. Sousa A, Laranjeiro F, Takahashi S, Tanabe S, Barroso CM. 2009. Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* 77:566-573.
18. Lahbib Y, Abidli S, Chiffolleau JF, Averty B, El Menif NT. 2009. First record of butyltin body burden and imposex status in *Hexaplex trunculus* (L.) along the Tunisian coast. *J Environ Monit* 11:1253-1258.
19. Gibson CP, Wilson SP. 2003. Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. *Mar Environ Res* 55:101-112.
20. Choi M, Moon HB, Yu J, Eom JY, Choi HG. 2010. Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels from Busan Harbor of Korea Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Arch Environ Cont Toxicol* 58:394-402.
21. Ruiz JM, Barreiro R, Couceiro L, Quintela M. 2008. Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. *Chemosphere* 73:1253-1257.
22. Wade TL, Sweet ST, Klein AG. 2008. Assessment of sediment contamination in Casco Bay, Maine, USA. *Environ Pollut* 152:505-521.
23. Castro IB, Bemvenuti CE, Fillmann G. 2007. Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *J Braz Soc Ecotox* 2:73-79.
24. Gibbs PE, Bryan GM, Pascoe PL, Burt GR. 1987. The use of dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J Mar Biol Ass U K* 67:507-523.
25. Fernandez MA, Wagener AdLR, Limaverde AM, Scofield AL, Pinheiro FM, Rodrigues E. 2005. Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Environ Res* 59:435-452.
26. IUPAC. 2002. (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 and Applied Chemistry* 74:835-855.

27. Galante-Oliveira S, Oliveira I, Pacheco M, Barroso CM. 2010. *Hydrobia ulvae* imposex levels at Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1998 and 2007: a counter-current bioindicator? *J Environ Monit* 12:500-507.
28. Díez S, Abalos M, Bayona JM. 2002. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Res* 36:905-918.
29. Guomundsdóttir LÓ, Ho KKY, Lam JCW, Svavarsson J, Leung KMY. 2011. Long-term temporal trends (1992-2008) of imposex status associated with organotin contamination in the dogwhelk *Nucella lapillus* along the Icelandic coast. *Mar Pollut Bull* In Press, Corrected Proof.
30. Cho HS, Seol SW, Horiguchi T. 2006. Less recovery from imposex and organotin pollution in the rock shell, *Thais clavigera* in Korea. *Mar Environ Res* 62:S224-S225.
31. Vasconcelos P, Gaspar MB, Barroso CM. 2010. Imposex in *Bolinus brandaris* from the Ria formosa lagoon (southern Portugal): usefulness of "single-site baselines" for environmental monitoring. *J Environ Monit* 12:1823-1832.
32. Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P. 1992. The Morphological Expression of Imposex in *Hinia-Reticulata* (Gastropoda, Buccinidae) - A Potential Indicator of Tributyltin Pollution. *Mar Biol* 113:625-636.
33. Smith AJ, Thain JE, Barry J. 2006. Exploring the use of caged *Nucella lapillus* to monitor changes to TBT hotspot areas: A trial in the River Tyne estuary (UK). *Mar Environ Res* 62:149-163.
34. Limaverde AM, de LRW, Fernandez MA, de LS, Coutinho R. 2007. *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. *Mar Environ Res* 64:384-398.
35. Barroso CM, Reis-Henriques MA, Ferreira MS, Moreira MH. 2002. The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. *J Mar Biol Ass U K* 82:249-255.
36. Mohamat-Yusuff F, Zulkifli S, Ismail A, Harino H, Yusoff M, Arai T. 2010. Imposex in *Thais gradata* as a Biomarker for TBT Contamination on the Southern Coast of Peninsular Malaysia. *Water, Air, & Soil Pollution* 211:443-457.
37. Santos DM, Araújo IP, Machado EC, Carvalho-Filho MAS, Fernandez MA, Marchi MRR, Godoi AF. 2009. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. *Mar Pollut Bull* 58:1926-1931.
38. Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Morita M. 1997. Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environ Pollut* 95:85-91.

39. Oliveira CR, Santos DM, Santos Madureira LA, Marchi MRR. 2010. Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. *J Hazard Mater* 181:851-856.
40. Matthews HR. 1968. Notes on the genus *Thais* Roding, 1798 in Northeast Brazil. *Archives of Marine Biological Station of Ceará Federal University* 8:37-41.
41. Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Yamazaki S, Morita M. 1995. Imposex in Japanese gastropods (neogastropoda and mesogastropoda): Effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints. *Mar Pollut Bull* 31:402-405.
42. Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL. 1991. Tbt-Induced Imposex in the Dogwhelk, *Nucella-Lapillus* - Geographical Uniformity of the Response and Effects. *Mar Environ Res* 32:79-87.
43. Ruiz JM, Díaz J, Albaina N, Couceiro L, Irabien A, Barreiro R. 2010. Decade-long monitoring reveals a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods. *Mar Pollut Bull* 60:931-934.
44. Bech M. 1998. Imposex and population characteristics of *Thais distinguenda* as an indicator of organotin contamination along the south east coast of phuket island, Thailand. *Phu Mar Biol Cent Spc Pub* 18:129-138.
45. Marinha do Brasil, Diretoria de Portos e Costa. Normas da autoridade arítima para o controle de sistemas antiincrustantes em embarcações. NORMAM-23/DPC. 2007.
46. Toste R, Fernandez MA, Pessoa IdA, Parahyba MA, Dore MP. 2011. Organotin pollution at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro State, Brazil: increasing levels after the TBT ban. *Braz j oceanogr* 59:111-117.

## **CAPÍTULO VI - COE, Irgarol e Diuron em áreas costeiras da América do Sul**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os níveis simultâneos de contaminação por COE e alguns biocidas de terceira geração (irgarol 1051 e diuron) em sedimentos de áreas sob a influência de importantes terminais portuários sul-americanos (estuário da Lagoa dos Patos, Golfo de Guayaquil e Golfo Nuevo). Esse artigo intitulado "*Irgarol, diuron e butilestânicos em zonas costeiras da América do Sul*", avalia a sobreposição da contaminação oriunda de anti-incrustantes de segunda e terceira gerações. O mesmo será submetido para publicação na revista "*Journal of Coastal Research*".

## Irgarol, Diuron e Butilestânicos em zonas costeiras da América do Sul

Ítalo Braga Castro<sup>1</sup>, Patrícia Gomes Costa<sup>1</sup>, Ednei Gilberto Primel<sup>2</sup>, Luís Alberto

Dominguez<sup>1</sup>, Gregório Bigatti<sup>3</sup> & Gilberto Fillmann<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Inst. de Oceanografia, Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO). Rio Grande – RS – Brasil 96201-900 / \*Autor para correspondência: [gfillmann@furg.br](mailto:gfillmann@furg.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química de Alimentos, Laboratório de Contaminantes Orgânicos e Metais (LACOM). Rio Grande – RS – Brasil 96201-900

<sup>3</sup> Centro Nacional Patagónico (CENPAT – CONICET). Bvd. Brown 2825. U9120ACV Puerto Madryn. Chubut, Argentina

### Resumo

As concentrações de butilestânicos (TBT, DBT e MBT), irgarol 1051 e diuron foram determinadas em sedimentos superficiais de três importantes estuários da América do Sul (Golfo de Guayaquil no Equador, o estuário da Lagoa dos Patos no Brasil e o Golfo Nuevo na Argentina). Os resultados indicaram que as três áreas encontram-se moderadamente impactadas pelo uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT já que as maiores concentração detectadas para esse composto foram respectivamente 207.4, 44.5 e 99.5 ng Sn g<sup>-1</sup>. Por outro lado, os Índices de butilestânicos degradados calculados para cada amostra indicaram que os aportes recentes desse composto estão diminuindo nas áreas estudadas e em outras localidades da América do Sul. Essa redução está ocorrendo provavelmente devido ao banimento mundial das tintas a base de TBT imposto pela Organização Marítima Internacional em setembro de 2008. Adicionalmente, os níveis de irgarol e diuron detectados no presente estudo provavelmente não representam risco para as comunidades locais, entretanto com base nos resultados obtidos, acredita-se que outros biocidas utilizados em tintas de terceira geração possam está sendo utilizados na América do Sul, sendo fundamental a realização de investigação mais profunda que esclareça o fato.

**Palavras- Chave:** anti-incrustante, TBT, contaminação, Porto

## **Introdução**

A utilização de sistemas anti-incrustantes em embarcações é fundamental para prevenir a adesão de organismos às estruturas expostas ao contato direto e prolongado com a água do mar (Almeida *et al.*, 2007). Sem esses revestimentos, processos de corrosão são acelerados e o consumo de combustível é incrementado em função do atrito provocado entre o casco da embarcação e a água. Conseqüentemente procedimentos de manutenção são necessários com maior frequência gerando também um volume maior de resíduos, ampliando os danos ambientais e os custos com transporte marítimo (Kotrikla, 2009).

Modernamente os sistemas anti-incrustantes utilizam tintas adicionadas de compostos químicos de atividade biocida, os quais juntamente com outros componentes da tinta, evitam que os organismos formadores das comunidades incrustantes (“*fouling*”) se estabeleçam sobre as superfícies protegidas (Almeida *et al.*, 2007). Na maioria dos casos esses biocidas são liberados das pinturas para coluna d’água provocando danos ambientais aos ecossistemas de áreas onde se observa grande fluxo de embarcações. Sendo assim, áreas sob a influência de terminais portuários, marinas e estaleiros são frequentemente contaminadas por esses compostos (Thomas & Brooks, 2010).

O Tributilestanho (TBT) foi utilizado durante as últimas quatro décadas como princípio ativo de tintas anti-incrustantes, sua grande eficiência aliada a sua durabilidade fizeram dos produtos a base deste organoestânico, os mais popularmente utilizadas na maioria dos grandes estaleiros mundiais durante a década de 1980 (Godoi *et al.*, 2003a). Entretanto, devido a sua elevada toxicidade e persistência, o uso do TBT em tintas dessa natureza foi banido pela Organização Marítima Internacional (IMO) em setembro de 2008 (IMO, 2008). Como consequência direta do banimento das tintas a base de TBT, a

indústria de tintas lançou no mercado novos produtos contendo outros biocidas, que a partir de então começaram a ser estudados quanto a sua toxicidade, ocorrência e comportamento ambiental (Castro *et al.*, *In Press*). Os novos biocidas homologados pela OMI para substituição do TBT em tintas anti-incrustantes são: diuron, irgarol 1051, sea-Nine, clorotalonil, diclofluanida, tiram, busan (TCMTB), TCMS piridina, trifetilbornano piridina, zinco piritona, cobre piritona, ziram, maneb, óxido cuproso, tiocianato de cobre e naftenato de cobre. A maioria desses compostos já eram anteriormente empregados como pesticidas agrícolas ou na indústria e começaram a ser usados em sistemas de revestimento anti-incrustante no final da década de 1980 (Castro *et al.*, *In Press*).

Dentre os compostos mencionados, o irgarol 1051 e o diuron, foram os primeiros a entrarem no mercado de tintas anti-incrustantes e atualmente já enfrentam restrições em alguns países da Europa (Readman, 2006). Essas restrições foram impostas devido a sua toxicidade, principalmente sobre organismos fitoplanctônicos (Mochida & Fujii, 2009; Hall *et al.*, 1999). Como foram largamente utilizados na Europa, Ásia e América do Norte, concentrações elevadas desses compostos tem sido detectadas em amostras de água e sedimentos oriundas de áreas navegadas desses continentes (Konstantinou & Albanis, 2004).

Na América do Sul, não existem até o momento estudos integrados voltados para avaliação dos níveis ambientais de irgarol 1051, diuron e TBT, e somente o Brasil e a Argentina possuem legislações que regulamentam o uso de tintas anti-incrustante. No Brasil a Norma da Autoridade Marítima Brasileira para o controle de sistemas anti-incrustantes danosos em embarcações (NORMAM/23) estabeleceu a partir do ano de 2007 procedimentos para remoção e repintura de embarcações que utilizavam anti-incrustantes a base de TBT (NORMAM/23, 2007). Na Argentina a norma da Prefeitura

Naval proibiu a utilização de tintas à base de TBT em todos os tipos de embarcações a partir de 1998 (DPMA, 1998). Adicionalmente nenhum país sul-americano regulamenta a utilização das novas tintas anti-incrustantes.

Com base neste cenário o presente estudo pretende avaliar os níveis de irgarol 1051, diuron, e TBT (bem como seus derivados, dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT)) em sedimentos de três importantes estuários navegados da América do Sul (Golfo de Guayaquil, Golfo Nuevo e estuário da Lagoa dos Patos) a fim de verificar a atual situação e apontar as tendências futuras desse tipo de contaminação nas respectivas áreas.

## **Material e Métodos**

### Áreas de estudo

#### *Golfo de Guayaquil (Equador)*

O golfo de Guayaquil (3°S, 80°W) é o maior sistema estuarino da costa oeste da América do Sul (12000 km<sup>2</sup>), esse sistema tem sido mencionado como um dos mais severamente impactados da região (Bryant *et al.*, 1995). Na foz do rio Guayas está Guayaquil, a maior cidade do Equador, com mais de 2 milhões de habitantes (Aguirre & Shervette, 2005). Adicionalmente o golfo abriga 2 dos 4 maiores terminais portuários do país (Guayaquil e Bolivar) além de diversos portos pesqueiros e turísticos ao longo de sua linha costeira.

#### *Estuário da Lagoa dos Patos (Brasil)*

A Lagoa dos Patos é a maior lagoa costeira da América do Sul (10.360 Km<sup>2</sup>), em seu encontro com o Oceano Atlântico forma-se um estuário que ocupa 10% de sua área (Medeiros *et al.*, 2005). Este estuário está exposto a efeitos antropogênicos



significativos visto que suas margens abrigam: o Superporto de Rio Grande (segundo maior terminal portuário do Brasil), e uma ampla atividade industrial representada por uma refinaria de petróleo, uma planta de produção de fertilizantes e indústrias de processamento de pescado. Além disso, o estuário da Lagoa dos Patos é margeado pela cidade de Rio Grande (185.000 habitantes) a qual verte, sem tratamento, seus efluentes domésticos e industriais no interior do mesmo (Mirlean *et al.*, 2003).

#### *Golfo Nuevo (Argentina)*

O Golfo Nuevo está localizado a noroeste da Província de Chubut na Patagônia Argentina, ao sul do istmo de Carlo Ameghido que comunica a Península Valdés com o continente. As margens do golfo Nuevo se encontra o terminal portuário de Puerto Madrin o qual, considerando os últimos anuários estatísticos, recebe anualmente mais de 700 embarcações (Administración Portuária, 2011). As margens do golfo também se encontram as cidades de Puerto Madryn e Puerto Pirâmides.

#### Obtenção das Amostras

Amostras de sedimentos superficiais (camada superior de 2 cm) foram coletados com auxílio de uma draga tipo “*van veen*” de aço inoxidável entre julho e setembro de 2009 no Golfo de Guayaquil (Equador), Golfo Nuevo (Argentina) e estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) (Figura 1). Imediatamente após as coletas, essas amostras foram liofilizadas e congeladas (-20 °C) até o momento da análises.

#### Caracterização dos Sedimentos

As concentrações de carbono orgânico total (% COT) foram determinadas em analisador elementar CHNS Perkin Elmer 2400 Series II, após prévia descarbonatação em dissecador com ácido clorídrico (HCl, 37%). A granulometria dos sedimentos foi

medida como porcentagem de areia fina, silte e argila conforme descrito por Gray (1981).



Figura 1: Localização dos três estuários estudados na América do Sul

#### Análise dos compostos butilestânicos

Os compostos butilestânicos (TBT, DBT and MBT) foram analisados conforme o seguinte método (Castro et al. *em preparação*). Aproximadamente 5 g de sedimentos

lioofilizados foram colocados em frascos de 40 mL, fortificados com 100 ng de Tripropilestanho (TPrT, padrão “*surrogate*”) e deixado equilibrar por 30 minutos. Posteriormente, 15 mL de uma solução de Tropolona 0.05 % (m/v) em metanol e 1 mL de Ácido Clorídrico (37%) foram adicionados ao frascos. Os mesmos foram sonificados em banho por 15 minutos e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes para cada amostra. Após centrifugação os sobrenadantes foram transferidos para um funil de decantação previamente adicionados de 150 mL de uma solução de NaCl 10% e extraídos 3 vezes com 20 mL de diclorometano. Esse extratos foram então coletados através de colunas contendo sulfato de sódio anidro e adicionados de 5 mL de hexano. O volume foi reduzido para 2 mL em evaporador rotatório a 40 °C, os extratos foram transferidos para frascos de 40 mL com tampa septada e derivatizados pela adição de 2 mL de brometo de pentilmagnésio em solução de éter dietílico (2 M) de acordo com Morabito et al.,(2000). Após a adição do derivatizante esses frascos foram vigorosamente agitados em vortex durante 1 minuto e deixados em repouso por 30 minutos com agitação ocasional. O excesso de derivatizante foi destruído pela adição de 15 mL de água ultrapura e 1 mL de HCl (37%), ambos previamente refrigerados a 4 °C. Essa etapa foi realizada em banho de gelo para evitar perdas por evaporação (Morabito *et al.*, 2000).

Posteriormente os butilestânicos pentilados foram removidos da mistura através de uma extração líquido-líquido com 5 mL de hexano (3 vezes), esse extrato foi então evaporado até aproximadamente 0.5 mL sob um fluxo moderado de nitrogênio e purificado pela passagem através de uma coluna de sílica (3.5g) previamente lavada com uma mistura de hexano-tolueno (1:1). A coluna foi eluída com 15 mL de solução de hexano-tolueno (1:1) e o eluato recolhido em tubos graduados. Depois o extrato purificado foi evaporado sob fluxo de nitrogênio até aproximadamente 0.9 mL e

adicionado de 100 ng de Tetrabutilestanho (padrão interno). Finalmente os extratos forma analisados em cromatógrafo a gás (CG) Perkin Elmer Clarus 500 equipado com um espectrômetro de massa e injetor automático.

O controle de qualidade foi baseado na análise regular de brancos intercalados as amostras, de amostras fortificadas e do material de referência certificado (MRC - PACS-2 / National Research Council of Canada, Ottawa, Canada). Os resultados obtidos para o MRC (TBT -  $871 \pm 36$  ng Sn g<sup>-1</sup>; DBT -  $1012 \pm 22$  ng Sn g<sup>-1</sup> e MBT -  $713 \pm 42$  ng Sn g<sup>-1</sup>) apresentaram boas concordância com os valores certificados (TBT -  $890 \pm 105$  ng Sn g<sup>-1</sup> e DBT -  $1047 \pm 64$  ng Sn g<sup>-1</sup>) e reportados (MBT -  $600$  ng Sn g<sup>-1</sup>). A recuperação do padrão “*surrogate*” ficou entre 78% e 107% e o desvio padrão relativo foi menor que 20 % (IUPAC, 2002). Os limites de quantificação (LQ) para TBT, DBT e MBT desse método foram respectivamente 2.0, 2.0 e 4 ng Sn g<sup>-1</sup>. Todas as concentrações foram expressas em ng Sn g<sup>-1</sup> (peso seco).

#### Análises de Irgarol e Diuron

As análises de irgarol 1051 e diuron seguiram a metodologia descrita por Dominguez (2010). Aproximadamente 10g de sedimentos secos foram adicionados em erlenmeyers juntamente com 25 mL de acetonitrila. Estes frascos foram agitados por 10 minutos em agitador orbital e os extratos centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes para cada amostra. Os extratos combinados foram novamente centrifugados, evaporados a 5 mL em evaporador rotativo e adicionados de 45 mL de água ultrapura. Posteriormente a mistura foi passada através de cartuchos de extração em fase sólida (C-18 / 500 mg) previamente ativados com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultra pura. Os cartuchos foram eluídos com 6 mL de metanol, concentrados a 1 mL sob fluxo moderado de nitrogênio e injetados em um sistema de cromatografia de fase líquida Alliance Separations, modelo 2695, Waters

(Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, detector de espectrometria de massas - EM (Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando modo de ionização por “*eletrospray*”, sistema de aquisição de dados através de software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra® C18 3,5 µm 144 Å (50 x 3 mm d.i.) (Waters, Millford, MA, USA). Os limites de quantificação (LQ) para esse método foram 0.1 ng g<sup>-1</sup> para irgarol 1051 e 0.2 ng g<sup>-1</sup> para diuron. A quantificação foi realizada por padronização externa e o controle de qualidade foi realizado através da análise de brancos intercalados com as amostras bem como de amostras fortificadas para ambos os analitos.

#### Análises estatísticas

As concentrações de TBT, DBT, MBT e a % de COT foram avaliadas quanto à normalidade e a homocedasticidade usando os testes de Kolmogorov-Smirnoff e Levene respectivamente. Correlações de Pearson, considerando cada área de estudo separadamente, foram realizadas para verificar a existência de correlações entre esses parâmetros. A fim de auxiliar a interpretação da distribuição espacial de Butilestânicos, Irgarol e Diuron no estuário da lagoa dos Patos foi realizada uma análise de Componentes Principais. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistica® (versão 6.0) com nível de significância de 0.05.

#### Resultados

As concentrações de Carbono Orgânico Total (% COT), Irgarol (ng g<sup>-1</sup>), Diuron (ng g<sup>-1</sup>), Butilestânicos (TBT, DBT e MBT (ng Sn g<sup>-1</sup>)) e os Índices de butilestânicos degradados ( $IBD = [DBT + MBT] / [TBT]$ ) obtidos para o golfo de Guayaquil, estuário da Lagoa dos Patos e golfo Nuevo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Carbono Orgânico Total (% COT), concentrações de irgarol ( $\text{ng g}^{-1}$ ), diuron ( $\text{ng g}^{-1}$ ), butilestânicos (TBT, DBT e MBT ( $\text{ng Sn g}^{-1}$ )) e Índices de butilestânicos degradados (IBD) obtidos para o golfo de Guayaquil, estuário da Lagoa dos Patos e golfo Nuevo.

Localidade	Estação	COT (%)	Irgarol Diuron		TBT DBT MBT			IBD
			$\text{ng g}^{-1}$		$\text{ng Sn g}^{-1}$			
Golfo de Guayaquil (Equador)	Posorja (E1)	1.05	n.d.	n.d.	35.7	8.2	102.2	3.1
	Porto de Guayaquil (E2)	2.31	n.d.	n.d.	48.6	15.5	110.3	2.6
	Porto de Guayaquil (E3)	2.13	n.d.	n.d.	40.9	6.3	68.7	1.8
	Balao (E4)	0.60	n.d.	n.d.	17.2	1.8	190.8	11.2
	Porto de Bolivar (E5)	2.25	n.d.	n.d.	99.5	54.4	339.9	4.0
	Jambeli (E6)	3.21	n.d.	n.d.	12.7	14.2	43.9	4.6
Lagoa dos Patos (Brasil)	Navio encalhado (B1)	0.03	n.d.	n.d.	4.9	< LQ	< LQ	n.c.
	Ilha das Pombas (B2)	0.28	< LQ	n.d.	< LQ	< LQ	< LQ	n.c.
	Iate Clube (B3)	1.90	< LQ	< LQ	4.8	2.5	155.8	33.2
	Mercado Público (B4)	0.75	< LQ	n.d.	31.9	6.2	90.5	3.0
	Praticagem (B5)	1.09	< LQ	n.d.	36.8	18.3	62.0	2.2
	Dique Seco (B6)	0.38	n.d.	n.d.	11.6	< LQ	131.8	11.3
	Porto velho (B7)	0.72	< LQ	n.d.	44.5	3.8	439.5	10.0
	Posto Náutico (B8)	1.70	< LQ	n.d.	28.2	12.0	139.4	5.4
	Diamante (B9)	1.34	n.d.	n.d.	3.9	< LQ	62.6	16.1
	Ilha da Base (B10)	0.79	0.2	< LQ	21.4	< LQ	15.7	0.7
	Estaleiro S.J. Norte (B11)	0.92	< LQ	< LQ	10.4	< LQ	12.5	1.2
	Saco da Mangueira (B12)	0.33	< LQ	< LQ	16.1	9.8	< LQ	0.6
	Posto Abastecimento (B13)	0.57	0.1	0.2	14.7	< LQ	35.1	2.5
	Coroa do Boi (B14)	0.20	< LQ	0.2	< LQ	< LQ	< LQ	n.c.
	Terminal Petrobras (B15)	0.94	< LQ	0.3	21.7	11.1	57.6	3.2
	Porto Novo (B16)	1.68	< LQ	0.4	18.2	< LQ	88.9	4.9
	Porto Novo 2 (B17)	1.71	< LQ	n.d.	15.7	18.0	168.0	11.8
	EMA (B18)	0.04	< LQ	n.d.	< LQ	< LQ	16.2	n.c.
	TERMASA (B19)	1.60	< LQ	< LQ	3.8	< LQ	60.9	16.2
	TECON (B20)	1.45	0.2	1.6	12.8	< LQ	60.7	4.7
	Mar Grosso (B21)	0.03	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	n.c.
Golfo Nuevo (Argentina)	Cerro Avanzado (A1)	0.24	n.d.	n.d.	< LQ	< LQ	< LQ	n.c.
	Muelle (A2)	0.39	n.d.	n.d.	207.4	16.4	63.8	0.4
	Punta Este (A3)	0.24	n.d.	n.d.	5.0	2.0	22.3	4.7
	Parque las Piedras (A4)	0.19	n.d.	n.d.	10.8	2.0	52.3	5.0

n.d.: não detectado / n.c.: não calculado / < LQ: menor que o limite de quantificação

## Golfo de Guayaquil (Equador)

Todas as amostras coletadas no golfo de Guayaquil apresentaram uma dominância de sedimentos finos (> 87%), e as % de COT variaram entre 0.6 (E4) e 3.2 (E6) (Tabela 1). Entretanto, não foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre esses parâmetros e as concentrações de Butilestânicos ( $p > 0.05$ ).

Resíduos de Butilestânicos foram detectados em todas as amostras do golfo de Guayaquil (Tabela 1). As concentrações de TBT, DBT e MBT encontradas foram respectivamente de 12.7 a 99.5, 1.8 a 58.4 e 43.9 a 339.9 ng Sn g<sup>-1</sup>. As maiores concentrações de TBT (> 35 ng Sn g<sup>-1</sup>) foram encontradas em Posorja (E1), porto de Guayaquil (E29 e E3) e no porto de Bolivar (E6) (Figura 2). Por outro lado, os menores níveis de TBT foram observados nas proximidades de pequenos portos pesqueiros ou turísticos como em Balao (E4 - 17.2 ng Sn g<sup>-1</sup>) e Jambeli (E6 - 12.7 ng Sn g<sup>-1</sup>). Adicionalmente, considerando todas as estações do golfo de Guayaquil, as concentrações de TBT mostraram uma correlação estatística significativa com as concentrações de DBT ( $r^2 = 0.80$ ) e MBT ( $r^2 = 0.61$ ) indicando que esses compostos têm provavelmente a mesma fonte, já que o DBT origina-se por degradação do TBT (Díez *et al.*, 2006).

Todos os valores de IBD obtidos para o golfo de Guayaquil foram maiores que 1 (Tabela 1), sendo que em Balao (E4) foi detectado o valor extremamente alto de 11.2, o qual reflete a grande predominância do MBT nessa amostra. Além disso, os valores de IBD foram relativamente menores nas estações localizadas ao longo do canal de acesso ao golfo de Guayaquil (E1, E2, e E3), indicando uma contribuição relativamente mais recente nesses locais.

Com relação às determinações de irgarol 1051 e diuron, resíduos desses compostos não foram detectados em nenhum das amostras analisadas.

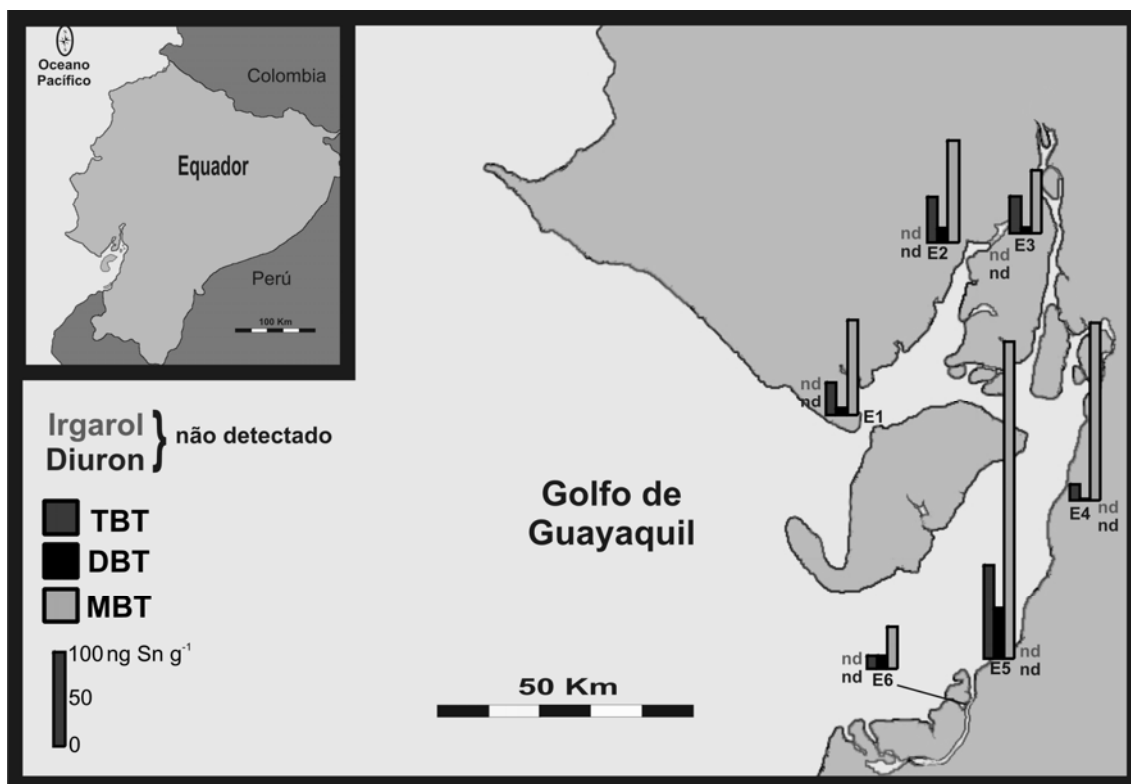


Figura 2: Estações de amostradas no golfo de Guayaquil (Equador) indicando as concentrações de TBT, DBT e MBT (barras) e presença ou ausência de irgarol 1051 e diuron.

#### Estuário da Lagoa dos Patos (Brasil)

Similarmente ao que se observou no golfo de Guayaquil, no estuário da Lagoa dos Patos também não foram observadas relações estatisticamente significativas entre a % de COT e as concentrações de Butilestânicos.

As concentrações de TBT nas amostras obtidas nessa área variaram de  $< 2.0$  a  $44.5 \text{ ng Sn g}^{-1}$ , sendo que os maiores valores foram observados nas proximidades do Porto velho (B7) (Figura 3). Para DBT, os valores detectados foram entre  $< 2.5$  e  $18.3 \text{ ng Sn g}^{-1}$ . Por outro lado, as concentrações de MBT apresentaram uma ampla faixa de variação com concentração desde  $< 3.5$  (B1, B2, B12, B15 e B21) até  $439.5 \text{ ng Sn g}^{-1}$  (B7). Essas concentrações proporcionalmente elevadas de MBT contribuíram para obtenção de valores de IBD maiores que 1 em praticamente todas as estações analisadas



no estuário da Lagoa dos Patos. Valores de IBD menores que 1 foram detectados somente para Ilha da base (B10, 0.7) e Saco da Mangueira (B12, 0.6).

No estuário da Lagoa dos Patos níveis detectáveis de Irgarol 1051 foram observados na maioria das amostras, tendo sido as maiores concentrações verificadas nas estações, Ilha da Base (B10, 0.2 ng g<sup>-1</sup>), Posto da Abastecimento (B13, 0.1 ng g<sup>-1</sup>) e TECON (B20, 0.2 ng g<sup>-1</sup>). Esse composto não foi detectado nas amostras referentes aos pontos B1, B6 e B9. Nos demais pontos de coleta as concentrações encontradas foram menores que o limite de quantificação (< 0,1 ng g<sup>-1</sup>) da técnica empregada. Concentrações mensuráveis de Diuron foram encontradas em 5 das 21 estações (B13, B14, B15, B16 e B20) com valores entre 0.2 e 1.6 ng g<sup>-1</sup>. Esse composto esteve ausente nas amostras referentes aos pontos B1, B2, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B17 e B18 e teve concentrações inferiores ao limite de quantificação (< 0.2 ng g<sup>-1</sup>) nas estações B3, B10, B11, B12, B19 e B21 (Figura 3).

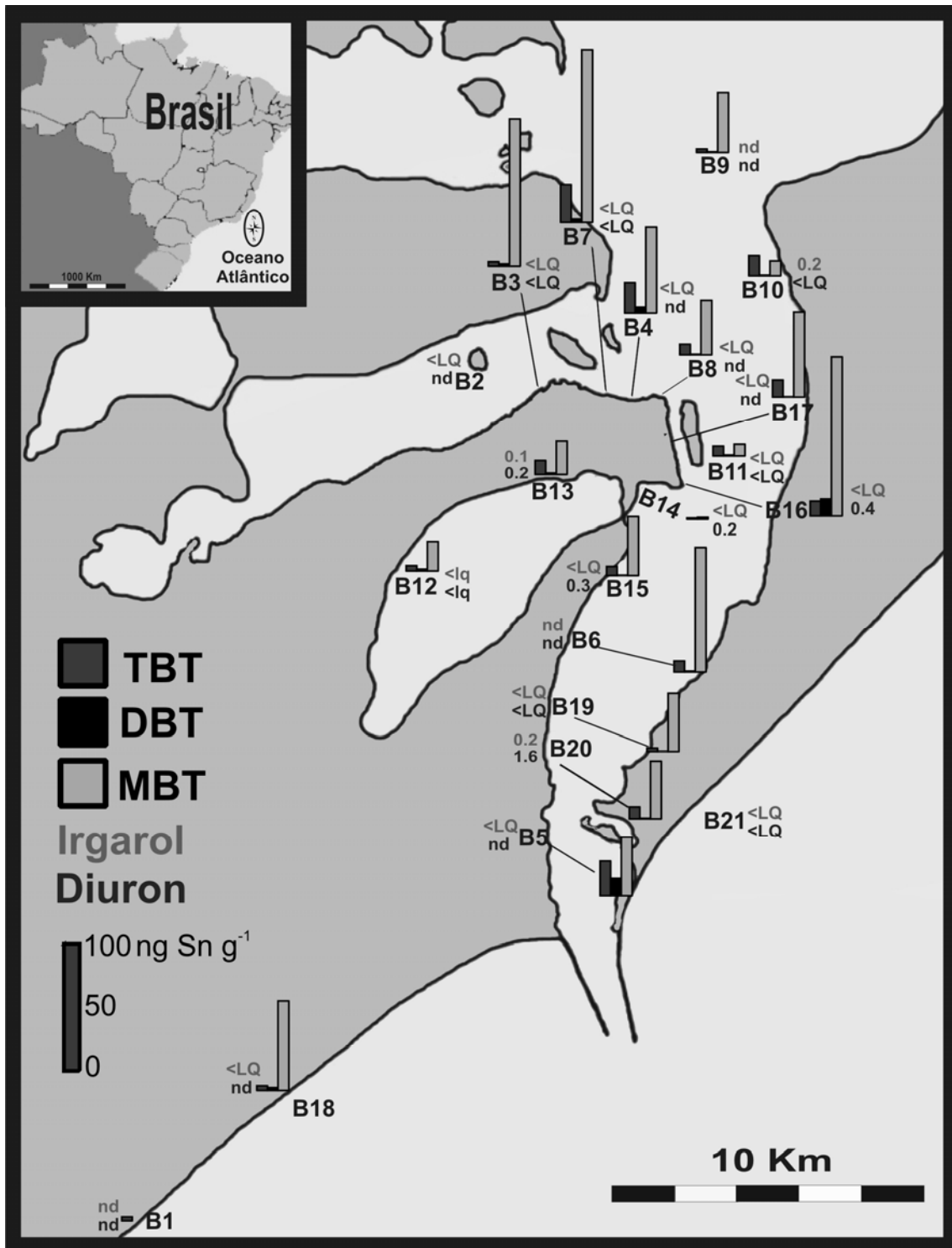


Figura 3: Estações de amostradas no estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) indicando as concentrações de TBT, DBT e MBT (barras) e presença ou ausência de irgarol 1051 e diuron.

## Golfo Nuevo (Argentina)

O percentual de COT obtido para os sedimentos oriundos do Golfo Nuevo esteve entre 0.19 e 0.39. Esses valores apresentaram uma boa correlação com as concentrações de TBT ( $r^2 = 0,9$ ) e DBT ( $r^2 = 0,9$ ) detectadas nessas amostras.

As concentrações de TBT nos sedimentos desse golfo variaram de  $< 2$  até  $207.4 \text{ ng Sn g}^{-1}$ . Para DBT e MBT as faixas de variação foram respectivamente de  $< 2.5$  até  $16.4$  e de  $< 3.5$  até  $63.8 \text{ ng Sn g}^{-1}$  (Figura 4). Com base nesses resultados os valores de IBD obtidos foram  $0.4$  para A2,  $4.7$  para A3 e  $5.0$  para A4, para estação A1 não foi possível calcular o IBD uma vez que todas as concentrações obtidas foram menores que os limites de detecção da técnica de análise empregada nesse estudo.

Similarmente ao que foi observado no Golfo de Guayaquil, no Golfo Nuevo não foram detectados traços de irgarol 1051 nem de diuron nas amostras analisadas (Figura 4).

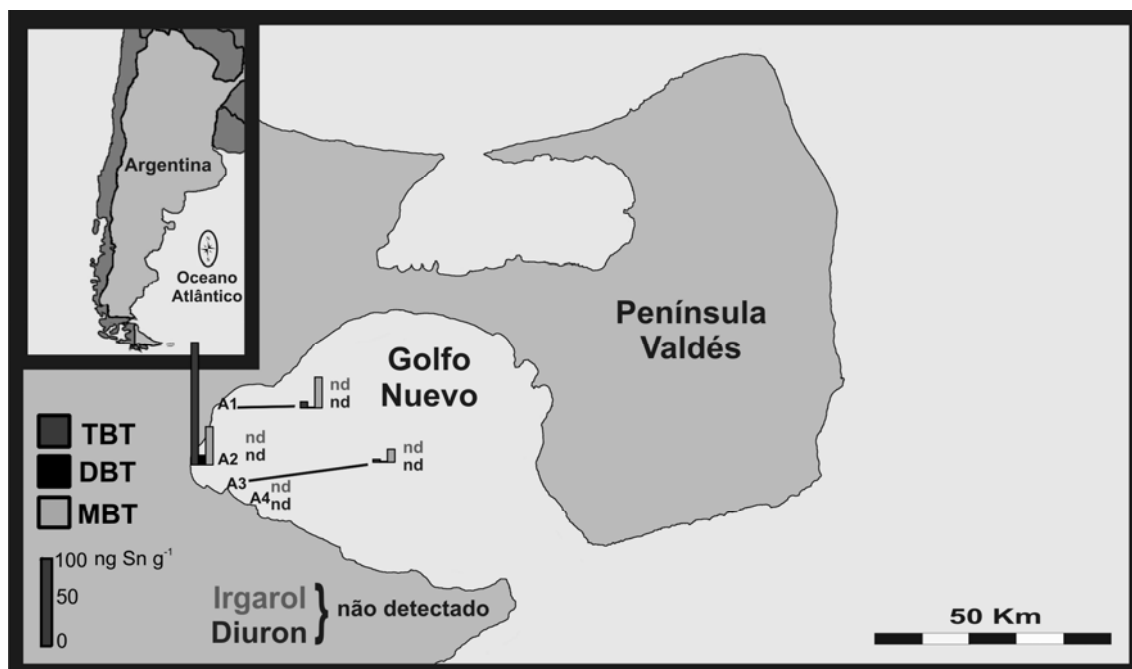


Figura 4: Estações de amostragem no golfo Nuevo (Argentina) indicando as concentrações de TBT, DBT e MBT (barras) e presença ou ausência de irgarol 1051 e diuron.

## Discussão

No presente estudo foram observadas correlações estatisticamente significativas entre as concentrações de butilestânicos e o % COT apenas nas amostras obtidas no golfo Nuevo (Argentina). Na literatura, resultados contraditórios têm sido reportados no que tange as correlações entre % COT e as concentrações de TBT e seus derivados (Pinochet *et al.*, 2009). Por exemplo, Shim *et al.* (1999) demonstraram correlações baixas entre esses valores para sedimentos superficiais de um porto Coreano, contraditoriamente, Pinochet *et al.* (2009) encontrou boas correlações entre % COT, TBT e DBT em sedimentos marinhos da Baía de San Vicente (Chile). Conforme, Town e Filella, (2002) esse comportamento inesperado pode ser devido a complexidade físico-química inerente aos sedimentos os quais apresentam diferentes composições de matéria orgânica a ele associada, além da existência de diferentes tipos de atividade biológica em suas distintas camadas.

Com relação às concentrações de TBT, o Golfo de Guayaquil, o estuário da Lagoa dos Patos e o Golfo Nuevo podem ser considerados moderadamente impactados, já que as maiores concentração de TBT detectadas nessas áreas foram 99.5, 207.4 e 44.5 ng Sn g<sup>-1</sup> respectivamente. Esses valores são relativamente baixos em comparação com outros estudos realizados na América do Sul onde, por exemplo, as concentrações de TBT determinados foram de 3228 ng Sn g<sup>-1</sup> em Bahía Blanca (Argentina) (Delucchi *et al.*, 2006), 2796 ng Sn g<sup>-1</sup> na baía de Paranaguá (Brasil) (Santos *et al.*, 2009) e 1560 ng Sn g<sup>-1</sup> na baía de San Vicente (Chile) (Pinochet *et al.*, 2009) (Tabela 2). Entretanto, essas comparações devem ser analisadas cuidadosamente visto que esses dados de campo podem ser influenciados por vários fatores ambientais.

Tabela 2: Concentrações de TBT, DBT e MBT obtidas em diversos estudos realizados na América do Sul em comparação com os resultados apresentados no presente estudo.

Localidade / País	Ano	Faixa de concentração (ng Sn g <sup>-1</sup> )			Referência
		TBT	DBT	MBT	
Costa de São Paulo, Brasil	1998	< 12 - 847	14 - 421	< 3 - 367	(Godoi <i>et al.</i> , 2003b)
Baía de Guanabara, Brasil	2001	< 2 - 742	< 2 - 90	< 3 - 21	(Almeida <i>et al.</i> , 2004)
Baía de Guanabara, Brasil	2000	10 - 522	< 5 - 395	< 5	(Fernandez <i>et al.</i> , 2005)
Baía de Paranaguá, Brasil	2006	nd - 2796	nd - 870	0 - 4063	(Santos <i>et al.</i> , 2009)
Baía de Todos os Santos, Brasil	2003	< 5 - 16	< 1 - 29	< 2 - 4	(Felizzola <i>et al.</i> , 2008)
Portos no Sul do Brasil	2007	nd - 1137	nd - 394	nd - 312	(Oliveira <i>et al.</i> , 2010)
Bahía Blanca, Argentina	2004	nd - 3228	nd - 1645	n.d.	(Delucchi <i>et al.</i> , 2006)
Baía de San Vicente, Chile	2006	2 - 1560	5 - 1170	< 27 - 470	(Pinochet <i>et al.</i> , 2009)
<b>Golfo de Guayaquil, Equador</b>	<b>2009</b>	<b>13 - 99</b>	<b>&lt; 2 - 58</b>	<b>44 - 340</b>	<b>Presente estudo</b>
<b>Lagoa dos Patos, Brasil</b>	<b>2009</b>	<b>&lt; 2 - 45</b>	<b>&lt; 2 - 18</b>	<b>&lt; 4 - 440</b>	
<b>Golfo Nuevo, Argentina</b>	<b>2009</b>	<b>&lt; 2 - 207</b>	<b>&lt; 2 - 16</b>	<b>&lt; 4 - 64</b>	

n.d.: não detectado

No Golfo de Guayaquil os níveis de TBT mostraram-se especialmente relacionados com a proximidade de terminais portuários comerciais como o porto de Guayaquil e o porto de Bolivar. Juntos, esses 2 terminais portuários são responsáveis por 65% do tráfego marítimo no Equador (Osorio, 2009) e aparentemente são os principais responsáveis pelo impacto produzido pelo TBT na região. Nesse contexto, um recente estudo verificou a ocorrência de imposex em 3 espécies de gastrópodes muricídeos em áreas sob a influência do Golfo de Guayaquil, e os resultados obtidos corroboram com as concentrações de TBT observadas no presente estudo, já que os maiores níveis de imposex foram também verificados nas áreas próximas aos portos de Guayaquil e Bolivar (Castro *et al.*, *In Press*; Osorio, 2009).

A interpretação da distribuição espacial de contaminantes no estuário da Lagoa dos Patos é influenciada por diversos fatores, tais como: a baixa profundidade do estuário (geralmente inferior a 2m) e a circulação estuarina regida principalmente pela ação dos ventos, do clima local e das descargas de rios (Calliari *et al.*, 2009; Mooller *et al.*, 2001). Além disso, a remobilização de sedimentos é um fenômeno frequente no

interior do estuário (Windom *et al.*, 1999). Sendo assim, não foram observados gradientes de contaminação para os analitos estudados em função da distância de suas fontes potenciais (portos, marinas e estaleiros). Entretanto, a análise de componentes principais realizada entre as concentrações de butilestânicos e a presença ou ausência de irgarol e diuron (Figura 5), mostrou uma similaridade entre os pontos B3, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B19 e B20. De fato, a maioria dessas zonas representam áreas de grande atividade naval no estuário, entretanto, as estações B4, B5, B6, B7, B8, B16 e B17 também se caracterizam por intenso fluxo de embarcações e de acordo com a análise foram agrupadas separadamente. Sendo assim, novos estudos devem ser realizados a fim de esclarecer a distribuição espacial desses contaminantes na Lagoa dos Patos.

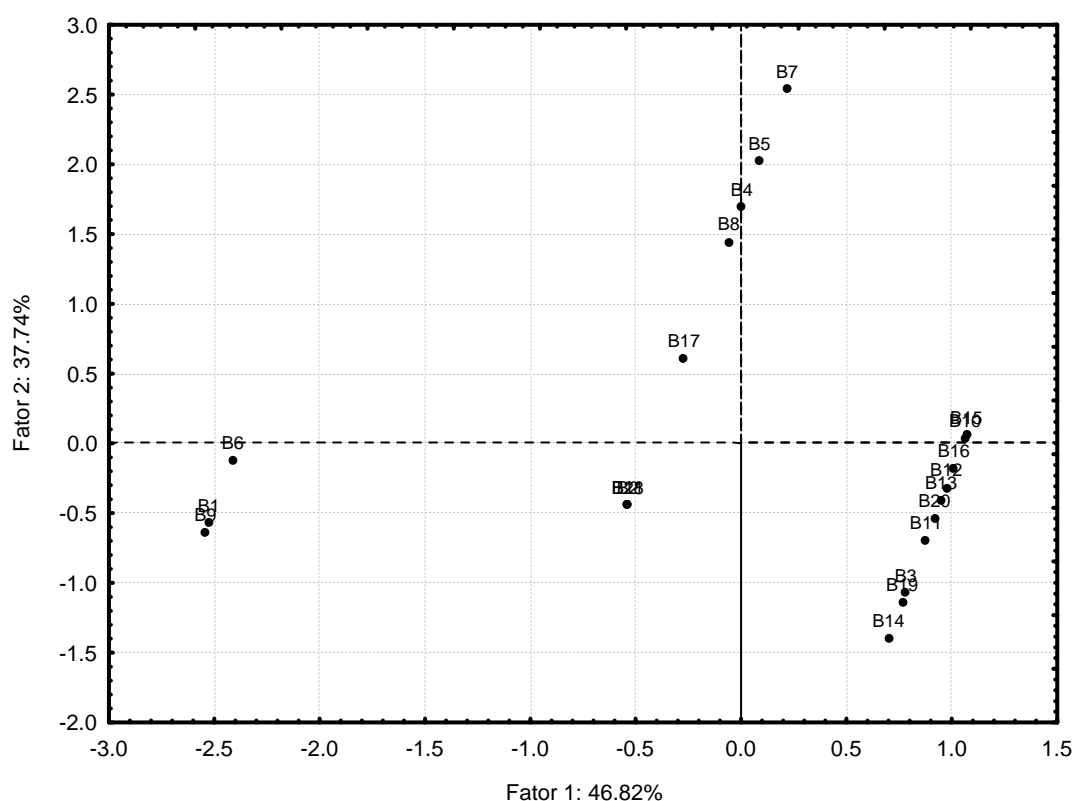


Figura 5: Análise de componentes principais para concentrações de TBT, DBT e MBT e a presença ou ausência de irgarol 1051 e diuron nas amostras obtidas no estuário da Lagoa dos Patos.

No Golfo Nuevo, as concentrações de TBT exibiram um gradiente de contaminação inversamente proporcional a distância do terminal portuário, esses resultados estão de acordo com diversos estudos que tem confirmado áreas portuárias como “hotspots” da poluição por TBT, por exemplo: no norte da Patagônia Argentina (Penchaszadeh *et al.*, 2009), Nordeste do Brasil (Castro *et al.*, 2007), Estreito de Johor na Malásia (Cob *et al.*, 2010), costa Portuguesa (Sousa *et al.*, 2009), ilhas Virgens (Strand *et al.*, 2009), China (Huang *et al.*, 2008) entre outros. Além disso, monitoramentos da ocorrência de imposex usando várias espécies de gastrópodes do golfo Nuevo mostraram gradientes similares (Bigatti & Carranza, 2007).

Uma vez despejado no ambiente aquático, o TBT sofre degradações sucessivas por desbutilação originando sequencialmente o Dibutilestanho (DBT) e o Monobutilestanho (MBT). A formação desses produtos de degradação pode ser mediada por atividade microbiana ou por reações abióticas (Maguire, 1984), podendo ainda ser acelerado por radiação UV e aumento da temperatura (Clark *et al.*, 1988). Com base na degradabilidade do TBT, Díez *et al.*(2002) propuseram um método simples para calcular um Índice de Butilestânicos Degradados (IBD) e fornecer informações temporais sobre os aportes desse composto em ambientes aquáticos. Esse índice é calculado de acordo com a equação,  $IBD = [MBT + DBT] / TBT$  e tem sido utilizado com sucesso em estudos recentes (Díez & Bayona, 2009; Díez *et al.*, 2006). De acordo com Díez *et al.*(2002), valores de IBD menores que 1 indicam aportes recentes de TBT, em contrapartida, um IBD maior que 1 sugere aporte antigo ou existência de processos de degradação rápidos para esse composto no ambiente.

Considerando os valores de IBD obtidos para o Golfo de Guayaquil, o estuário da Lagoa dos Patos e o Golfo Nuevo os aportes de TBT parecem ser antigos, ou alternativamente houve uma rápida degradação desse composto nestas áreas, visto que o

valor de IBD foi superior a 1 em 22 das 25 estações onde foi possível calcular esse índice. Estudos recentes realizados em 4 estuários sul-americanos (Paranaguá (Santos *et al.*, 2009) São Francisco do Sul, Imbituba e Itajaí (Oliveira *et al.*, 2010)) também mostraram a predominância das concentrações de DBT e MBT em relação ao TBT. Isso mostra que uma atenuação natural combinada como uma redução dos aportes está provavelmente contribuindo para remediação dos sedimentos em zonas costeiras da América do Sul. Conforme Castro *et al.* ( *In Press*) a maior parte dos países do continente não possui legislações restritivas ao uso do TBT em tintas anti-incrustantes, sendo assim, esses resultados estão provavelmente relacionados ao banimento mundial do TBT imposto pela OMI em setembro de 2008. Valores de IBD extremamente altos (> 10) foram verificados no golfo de Guayaquil (E4) e em várias estações de coleta da Lagoa dos Patos ( B3, B6, B7, B9, B17 e B19). Esses valores são provavelmente devido à presença de atividade microbiológica intensa nos pontos amostrados. Por exemplo, no caso da estação E4 (golfo de Guayaquil), existe nas proximidades, um efluente de uma grande fazenda de cultivo de camarões a qual provavelmente contribui para atividade biológica intensa na região (Sakami *et al.*, 2008)

A ausência de irgarol 1051 e de diuron nas amostras oriundas do golfo de Guayaquil e do golfo Nuevo, sugere que outros biocidas podem está sendo utilizados no Equador e na Argentina em substituição ao TBT, ou alternativamente, que as taxas de degradação desses compostos em sedimentos das regiões estudadas são extremamente elevadas a ponto de inviabilizarem sua detecção pela metodologia empregada. Nesse aspecto outros estudos devem ser empreendidos no Golfo de Guayaquil e no Golfo Nuevo a fim de verificar quais biocidas de terceira geração poderiam está sendo usados nas embarcações locais.



No estuário da Lagoa dos Patos, por outro lado, níveis detectáveis de Irgarol e Diuron foram observados na maioria das estações. Considerando apenas o diuron, é importante ressaltar que outras fontes, além do tráfego marítimo, podem contribuir com aportes desse composto para o estuário, visto que ele é largamente utilizado na agricultura desde a década de 1950 (Yebera *et al.*, 2004). Por outro lado o Irgarol é utilizado exclusivamente como biocida em sistemas anti-incrustantes (Readman, 2006) sendo os níveis detectados no presente estudo atribuídos a presença de portos, estaleiros e marinas na região. Embora os níveis de irgarol e diuron detectados no estuário da Lagoa dos Patos sejam extremamente baixos e não representem risco para o ecossistema, é importante ressaltar que provavelmente outros biocidas utilizados nas novas tintas anti-incrustantes estão presentes no sistema estuarino e que os efeitos ambientais sinérgicos advindos dessa possível combinação são ainda desconhecidos.

Adicionalmente o presente estudo avaliou pela primeira vez os níveis de contaminação por butilestânicos, irgarol 1051 e diuron nas áreas estudadas a fim de permitir comparações futuras e o acompanhamento da evolução desse tipo de impacto. Tal iniciativa é extremamente importante já que estamos em um momento de transição onde uma grande variedade de compostos tem sido utilizados em sistemas anti-incrustantes em função das novas legislações e do desenvolvimento de novas tecnologias por parte da indústria de tintas (Castro *et al.*, *In Press*).

## **Conclusão**

Com base no exposto, pode-se concluir que o Golfo de Guayaquil (Equador), o estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) e o Golfo Nuevo (Argentina) estão moderadamente impactados pela utilização de sistemas anti-incrustantes a base de TBT. Por outro lado, considerando os valores de IBD, verificou-se que os aportes recentes desse composto estão diminuindo nas áreas estudadas e em outras localidades da América do Sul. Sendo

assim, uma atenuação natural das concentrações de TBT em sedimentos está ocorrendo provavelmente devido à resolução proibitiva imposta pela OMI em setembro de 2008.

Os níveis de irgarol e diuron detectados aparentemente não representam risco para as comunidades locais, entretanto com base nos resultados obtidos, acredita-se que outros biocidas utilizados em tintas de terceira geração possam estar sendo utilizados na América do Sul, sendo fundamental a realização de investigação mais profunda que esclareça o fato.

## Referências

- Administración Portuária. Anuários Estadísticos do Porto de Puerto Madrin. <http://www.appm.com.ar/>. 2011. 17-11-2011.  
Ref Type: Electronic Citation
- Aguirre, W.E. and Shervette, V.R. (2005). Morphological diversity of the *Cynoscion* group (Perciformes: Sciaenidae) in the Gulf of Guayaquil region, Ecuador: A comparative approach. *Environmental Biology of Fishes* **73**, 403-413.
- Almeida, A.C., Wagener, A.D.R., Maia, C.B., and Miekeley, N. (2004). Speciation of organotin compounds in sediment cores from Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Applied Organometallic Chemistry* **18**, 694-704.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., and de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* **59**, 2-20.
- Bigatti, G. and Carranza, A. (2007). Phenotypic variability associated with the occurrence of imposex in *Odontocymbiola magellanica* from Golfo Nuevo, Patagonia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **87**, 1-5.
- Bryant, D., Rodenbur, E., Cox, T., and Nielsen, D. (1995). Coastlines at Risk: an Index of Potential Development-Related Threats to Coastal Ecosystems. WRI Indicator Brief World Resources Institute, Washington, D.C.,
- Calliari, L.J., Winterwerp, J.C., Fernandes, E., Cuchiara, D., Vinzon, S.B., Sperle, M., and Holland, K.T. (2009). Fine grain sediment transport and deposition in the Patos Lagoon-Cassino beach sedimentary system. *Continental Shelf Research* **29**, 515-529.
- Castro, I.B., Lima, A.F.A., Braga, A.R.C., and Rocha-Barreira, C.A. (2007). Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* **2**, 81-91.
- Castro, I.B., Osorio, M.F.A., Costa, G.P., and Fillmann, G. (*In Press*). Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Castro, I.B., Perina, F.C., and Fillmann, G. (*In Press*). Review of organotins contamination in South America. *Environmental Monitoring and Assessment*.

- Castro, I.B., Westphal, E., and Fillmann, G. (*In Press*). Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*.
- Clark, E.L., Sterrit, R.M., and Lester, J.N. (1988). The Fate of Tributyltin in the Aquatic Environment a Look at the Data. *Env.Sci.Tech.* **22**, 600-604.
- Cob, Z., Arshad, A., Bujang, J., and Ghaffar, M. (2010). Description and evaluation of imposex in *Strombus canarium* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Strombidae): a potential bio-indicator of tributyltin pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 1-8.
- Delucchi, F., Tombesi, N.B., Freije, R.H., and Marcovecchio, J.E. (2006). Butyltin compounds in sediments of the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* **132**, 445-451.
- Díez, S., Abalos, M., and Bayona, J.M. (2002). Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Research* **36**, 905-918.
- Díez, S. and Bayona, J.M. (2009). Butyltin occurrence and risk assessment in the sediments of the Iberian Peninsula. *Journal of Environmental Management* **90**, S25-S30.
- Díez, S., Jover, E., Albaiges, J., and Bayona, J.M. (2006). Occurrence and degradation of butyltins and wastewater marker compounds in sediments from Barcelona harbor, Spain. *Environment International* **32**, 858-865.
- Dominguez, L.A. (2010). Determinação dos anti-incrustantes Diuron e Irgarol na Região estuarina de Rio Grande - RS. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 112 p.
- DPMA. Prefectura Naval Argentina. Ordenanza 4/98 Tomo 6, Régimen para la proteccion del medio ambiente. Anexo 1. 1998.  
Ref Type: Statute
- Felizzola, J.F., Wagener, A.d.L.R., Almeida, A.C., and Lin, W.O. (2008). Butyltin speciation in sediments from Todos os Santos Bay (Bahia, Brazil) by GC-PFPD. *Química Nova* **31**, 89-93.
- Fernandez, M.A., Wagener, A.d.L.R., Limaverde, A.M., Scofield, A.L., Pinheiro, F.M., and Rodrigues, E. (2005). Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research* **59**, 435-452.
- Godoi, A.F.L., Favoreto, R., and Santiago-Silva, M. (2003a). Contaminação Ambiental Por Compostos Organoestânicos. *Química Nova* **26**, 708-716.
- Godoi, A.F.L., Montone, R.C., and Santiago-Silva, M. (2003b). Determination of butyltin compounds in surface sediments from the Sao Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography* **985**, 205-210.
- Gray, J.S. (1981). The Ecology of Marine Sediments. *Cambridge, University Press*, New York.
- Hall, L.W., Giddings, J.M., Solomon, K.R., and Balcomb, R. (1999). An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Critical Reviews in Toxicology* **29**, 367-437.
- Huang, C.J., Zhu, S.X., Lin, J.D., and Dong, Q.X. (2008). Imposex of *Mauritia arabica* on the south-eastern coast of China. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **88**, 1451-1457.
- IMO (2008). Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. International Maritime Organization, United Kingdom,

- IUPAC (2002). (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 and Applied Chemistry* **74**, 835-855.
- Konstantinou, I.K. and Albanis, T.A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* **30**, 235-248.
- Kotrikla, A. (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management* **90**, S77-S85.
- Maguire, R.J. (1984). Butyltin compounds and inorganic tin in sediments in Ontario. *Environmental Science and Technology* **18**, 291-294.
- Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelao, R.M., Del Rosso, C., Fillmann, G., and Zamboni, A.J. (2005). Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environment International* **31**, 77-87.
- Mirlean, N., Andrus, V.E., and Baisch, P. (2003). Mercury pollution sources in sediments of Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 331-334.
- Mochida, K. and Fujii, K. (2009). Toxicity for Aquatic Organisms. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 148-160.
- Mooller, O., Castaing, P., Salomon, J.C., and Lazure, P. (2001). The influence of local and non-local forcing effects on the subtidal circulation of Patos Lagoon. *Estuaries and Coasts* **24**, 297-311.
- Morabito, R., Massanisso, P., and Quevauviller, P. (2000). Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **19**, 113-119.
- NORMAM/23 (2007). Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações - NORMAM/23. Marinha do Brasil, Rio de Janeiro,
- Oliveira, C.R., Santos, D.M., Santos Madureira, L.A., and Marchi, M.R.R. (2010). Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. *Journal of Hazardous Materials* **181**, 851-856.
- Osorio, M.F.A. (2009). Imposex en Muricideos (Mollusca: Gastropoda) del perfil costero ecuatoriano, una indicación de contaminación por compuestos organoestañosos. Master, Universidad de Guayaquil, 114 p.
- Penchaszadeh, P., Antelo, C., Zabala, S., and Bigatti, G. (2009). Reproduction and imposex in the edible snail *Adelomelon ancilla* from northern Patagonia, Argentina. *Marine Biology* **156**, 1929-1939.
- Pinochet, H., Tessini, C., Bravo, M., Quiroz, W., and De Gregori, I. (2009). Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay, Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* **155**, 341-353.
- Readman, J. (2006). Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends. In: I.K. Konstantinou (eds.), *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-15.
- Sakami, T., Fujioka, Y., and Shimoda, T. (2008). Comparison of microbial community structures in intensive and extensive shrimp culture ponds and a mangrove area in Thailand. *Fisheries Science* **74**, 889-898.
- Santos, D.M., Araújo, I.P., Machado, E.C., Carvalho-Filho, M.A.S., Fernandez, M.A., Marchi, M.R.R., and Godoi, A.F. (2009). Organotin compounds in the Paranaguá

- Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. *Marine Pollution Bulletin* **58**, 1926-1931.
- Shim, W.J., Oh, J.R., Kahng, S.H., Shim, J.H., and Lee, S.H. (1999). Horizontal distribution of butyltins in surface sediments from an enclosed bay system, Korea. *Environmental Pollution* **106**, 351-357.
- Sousa, A., Laranjeiro, F., Takahashi, S., Tanabe, S., and Barroso, C.M. (2009). ImPOSEX and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* **77**, 566-573.
- Strand, J., JØrgensen, A., and Tairova, Z. (2009). TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea. *Environment International* **35**, 707-711.
- Thomas, K.V. and Brooks, S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* **26**, 73-88.
- Town, R.M. and Filella, M. (2002). Implications of natural organic matter binding heterogeneity on understanding lead(II) complexation in aquatic systems. *Science of the Total Environment* **300**, 143-154.
- Windom, H.L., Niencheski, L.F., and Smith, R.G. (1999). Biogeochemistry of Nutrients and Trace Metals in the Estuarine Region of the Patos Lagoon (Brazil). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **48**, 113-123.
- Yebra, D.M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology: past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75-104.

## DISCUSSÃO GERAL

Conforme apresentado no capítulo I, o impacto produzido pela utilização de tintas anti-incrustantes na América do Sul ainda é insuficientemente conhecido. A falta de informações é ainda mais grave no que tange a costa oeste do continente e aos biocidas utilizados em tintas de terceira geração. Durante a realização desse estudo algumas dessas lacunas foram parcialmente preenchidas, entretanto outros questionamentos surgiram em razão dos novos conhecimentos adquiridos.

O banimento mundial das tintas anti-incrustantes, ocorrido definitivamente em setembro de 2008 através da “*Antifouling System Convention*”, tem se mostrado efetivo na redução dos níveis ambientais de compostos orgânicos de estanho (COE), bem como de seus mais conhecidos impactos, nos países desenvolvidos (Sonak, 2009). A exemplo disso, diversos estudos com séries temporais registraram diminuições nas concentrações de TBT em zonas costeiras da Ásia (Choi *et al.*, 2010), Europa (Ruiz *et al.*, 2008) e América do Norte (Wade *et al.*, 2008). Similarmente, os níveis de imposex em moluscos gastrópodes também apresentaram redução durante os últimos 3 anos em várias regiões ao redor do mundo, inclusive sendo registrada a recuperação de determinadas populações que se encontravam em franco declínio (Sousa *et al.*, 2009; Morton, 2009).

Na América do Sul a carência de informações pretéritas sobre os níveis ambientais de COE, aliado à quase ausência de legislações locais que regulamentassem a venda e a utilização desses produtos, contribuiu para dificultar a implementação a nível regional do banimento mundial desses compostos, bem como a verificação do impacto resultante da implementação desta medida a nível internacional (Castro, Perina, and Fillmann, *In Press*). Além disso, a elevada eficiência das tintas a base de TBT e a

ausência de um substituto com desempenho similar criou uma relutância por parte da indústria naval em abolir o uso desses compostos (Almeida *et al.*, 2007). Dessa forma, especula-se que diversas embarcações tenham adotado bandeiras de conveniência no intuito de escapar a legislações locais em vigor na maioria dos países desenvolvidos desde o final da década de 1980 (Wilson, 2008). Esse fato, pode ter afetado diretamente a América do Sul, na medida em que é possível que países sul-americanos (a maioria dos quais, sem legislação sobre o uso de tintas anti-incrustantes ((Castro, Perina, and Fillmann, *In Press*)) possam ter sido usados na repatriação dessas embarcações. Além disso, é sabido que, pelo menos no Brasil, óxido e cloreto de tributilestanho são livremente comercializados (CESBRA, 2011), podendo ser utilizados em formulações não industriais e, conseqüentemente, contribuir para continuidade dos aportes de TBT nos sistemas aquáticos.

A avaliação preliminar da ocorrência de imposex apresentada no capítulo II desse estudo demonstrou que as áreas costeiras sob a influência dos terminais portuários de Paranaguá, São Francisco do Sul, Itajaí e Rio Grande encontravam-se contaminadas por compostos organoestânicos (Castro *et al.*, 2007a). Conforme já havia sido reportado por outros estudos, os níveis de imposex na maioria dessas áreas apresentaram uma distribuição espacial inversamente proporcional a distância dos terminais portuários (Castro *et al.*, 2007b). Embora nesse estudo não tenha sido realizado determinações de COE nas amostras, outras investigações realizadas *a posteriori* nas mesmas áreas confirmaram a presença de TBT e derivados, bem como a ocorrência de elevados níveis de contaminação nas áreas mais próximas aos terminais portuários (Oliveira *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009).

A determinação analítica de COE em amostras ambientais foi durante muitos anos, um fator limitante a realização de estudos com organoestânicos na América do

Sul, visto que a maioria dos estudos publicados apresentava somente dados referentes à ocorrência de imposex em moluscos gastrópodes (Castro *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2007c; Castro, 2005). Dessa forma, a validação metodológica apresentada no capítulo III foi uma etapa fundamental ao desenvolvimento deste trabalho, permitindo que um novo laboratório fosse capacitado na análise de COE em matrizes ambientais. A determinação de compostos organoestânicos por cromatografia a gás envolve diversas etapas de elevada complexidade (Morabito *et al.*, 1995). Adicionalmente as matrizes ambientais costumam apresentar moléculas interferentes que podem provocar falsas interpretações dos cromatogramas obtidos (Kearle & Tang, 1993). Embora o efeito de matriz já houvesse sido reportado em análises de COE (Tang & Wang, 2007), o artigo apresentado no capítulo III descreve pela primeira vez a ocorrência desse problema em determinações utilizando derivatização por reação de Grignard e cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa. O efeito de matriz foi efetivamente eliminado utilizando-se as técnicas de adição padrão e sobreposição de matriz. Isso permitiu a validação do método em concordância com normas internacionalmente aceitas (SANCO, 2009).

Esses métodos analíticos envolvem a utilização de equipamento e reagentes extremamente onerosos, tornando-se muitas vezes inviáveis para instituições de países em desenvolvimento. Além disso, a questão ambiental relacionada ao uso de tintas anti-incrustantes nunca foi priorizada por nenhum país sul-americano. Recentemente, este tema tem sido priorizado por alguns grupos de pesquisa no Brasil e Argentina, entretanto a capacitação analítica continua sendo uma questão limitante. Porém, algumas iniciativas vêm sendo tomadas para minimizar estas limitações, como a execução de dois projetos de âmbito nacional financiados pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).



O projeto intitulado “*Impacto da utilização de tintas anti-incrustantes nos principais terminais portuários brasileiros*”, sob a coordenação do Prof. Dr. Gilberto Fillmann, realizará uma avaliação simultânea dos níveis de imposex, COE e de biocidas de terceira geração nas áreas sob a influência dos 22 maiores terminais portuários brasileiros. Para tanto, uma rede de investigação está sendo organizada de norte a sul do País, envolvendo a todos os pesquisadores que atuam nesta área do conhecimento, assim como alguns novos colaboradores. Com isso outros, dois outros laboratórios brasileiros serão beneficiados com a infraestrutura e a tecnologia necessárias para a determinação de organoestânicos em matrizes ambientais, contribuindo assim, para a ampliação da capacidade analítica que é um dos principais limitantes para o avanço no conhecimento do impacto gerado pelo uso de sistemas anti-incrustantes na América do Sul. Além disso, esse projeto também elaborará um plano de gestão para portos, marinas e estaleiros do Brasil focado diretamente na problemática ambiental das tintas anti-incrustantes.

Adicionalmente, o projeto “*Tintas anti-incrustantes utilizadas nos estaleiros brasileiros: relação entre eficiência e risco ambiental*”, coordenado pela Profa. Dra. Grasiela Lopes Pinho, avaliará questões relacionadas à toxicidade e eficiência das tintas anti-incrustantes comercializadas no Brasil, a fim de indicar a melhor relação custo-benefício na escolha de sistemas anti-incrustantes pela construção naval.

No âmbito internacional, um projeto em cooperação com o grupo do Dr. Gregório Bigatti (CENPAT-Argentina) vem avaliando os níveis de imposex, COE e biocidas de terceira geração ao longo de importantes terminais portuários da costa Argentina. Sendo assim, a exemplo do que foi realizado com no Equador e no Perú, será possível estabelecer um panorama atual do impacto produzido pelo uso de tintas anti-incrustantes ao longo de praticamente toda costa leste da América do Sul.

Considerando a carência de informações sobre o impacto produzido pelo uso de sistemas anti-incrustantes na costa oeste da América do Sul, a qual foi apresentada em Castro et al. (2011), o capítulo IV do presente estudo realizou uma avaliação preliminar da contaminação por compostos butilestânicos (TBT, DBT e MBT), bem como da ocorrência de imposex em moluscos gastrópodes em áreas sob a influência de importantes zonas de tráfego marítimo da costa do oceano Pacífico. Os resultados apresentados para a costa do Equador sugerem níveis de contaminação mais severa em regiões próximas aos portos comerciais de Guayaquil e Bolívar, em contrapartida níveis mais baixos de imposex foram observados em zonas sob a influência de terminais pesqueiros ou turísticos. Resultados semelhantes foram observados durante o estudo realizado na costa do Perú, onde os níveis de contaminação mais elevados foram observados na região do Porto de Callao, o qual também é um terminal comercial utilizado por embarcações de grande calado. Durante a realização desses dois estudos foi verificado pela primeira vez na América do Sul a ocorrência de imposex nas espécies *Thais kiosquiformis*, *Thais brevidentata*, *Thais biserialis* e *Thais chocolata*. Esses organismos mostraram-se apropriados para utilização como indicadores da contaminação por COE, visto que apresentam uma distribuição geográfica ampla e elevada sensibilidade à contaminação por esses compostos. Com relação aos níveis de imposex observados nas duas regiões, eles se mostraram altos em comparação com estudos contemporâneos realizados em outros países (Abidli *et al.*, 2010; Cob *et al.*, 2010). A utilização dessas espécies, aliadas a *Acanthina monodon* que foi previamente utilizada na costa do Chile como biomarcador da contaminação por organoestânicos (Huaquin *et al.*, 2004), pode ser proposta em futuros programas multinacionais de monitoramento para costa oeste da América do Sul, já que juntas essas espécies cobrem praticamente toda a extensão oeste do continente (Mair *et al.*, 2002; Abbott & Dance,

1982; Keen & McLean, 1971). Entretanto, estudos comparativos quanto à sensibilidade diferencial desses organismos a contaminação por COE, devem ser previamente realizados. As concentrações de COE detectadas em amostras oriundas das áreas costeiras do Equador, associada à interpretação dos índices de butilestânicos degradados, sugere que o banimento mundial das tintas a base de TBT não está sendo efetivo na costa oeste na América do Sul. Contraditoriamente os valores encontrados na costa peruana mostram que aportes recentes de TBT estão ocorrendo nas áreas portuárias daquele país. Essa discrepância indica que parâmetros oceanográficos e legislativos de cada localidade devem ser observados durante avaliações da efetividade do banimento mundial do TBT.

Com base nos resultados obtidos no estudo preliminar realizado em janeiro de 2006, o qual avaliou a ocorrência de imposex em áreas portuárias do sul do Brasil (Capítulo II), uma nova amostragem foi empreendida em 2010 nos mesmos pontos amostrados anteriormente. Esse estudo foi realizado com objetivo de comparar cenários anteriores e posteriores à implementação do banimento mundial do TBT e da Norma da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações (NORMAM/23) ocorridos em setembro de 2008 e novembro de 2007, respectivamente. Os resultados desse novo estudo apresentados no capítulo V demonstraram uma drástica redução nos níveis de imposex em todas as regiões portuárias analisadas (Paranaguá, São Francisco do Sul, Itajaí e Rio Grande). Apesar dessa redução, concentrações remanescentes de compostos organoestânicos foram detectadas nos organismos analisados em 2010. A fim de explicar esses resultados, duas hipóteses podem ser postuladas: (1) os níveis anteriores de TBT acumulados nos tecidos desses organismos, responsáveis pela geração de imposex, eram bem superiores aos detectados em 2010 ou, (2) os organismos onde se verificou a ausência atual de imposex

associada a concentrações de TBT apresentam uma maior tolerância à exposição a esse composto. Esta última situação foi observada por Rossato e colaboradores (2011) em populações de *S. hameastoma* oriundas da região Sul do Brasil. Sendo assim, estudos futuros devem ser realizados a fim de melhor esclarecer o fato.

As concentrações de butilestânicos (TBT, DBT e MBT), determinadas no estudo apresentado no capítulo VI deste trabalho indicam que o Golfo de Guayaquil no Equador, o estuário da Lagoa dos Patos no Brasil e o Golfo Nuevo na Argentina encontram-se moderadamente impactados pelo uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT. Essa observação decorre do fato de que as maiores concentração detectadas para esse composto em sedimentos das referidas áreas de estudo (99,5; 44,5 e 207,4 ng Sn g<sup>-1</sup>, respectivamente) foram inferiores aos valores obtidos por outros estudos realizados em estuários sul-americanos considerados muito contaminados, como, por exemplo, Bahia Blanca na Argentina (3228 ng Sn g<sup>-1</sup>) (Delucchi *et al.*, 2006), baía de Paranaguá no Brasil (2796 ng Sn g<sup>-1</sup>) (Santos *et al.*, 2009) e baía de San Vicente no Chile (1560 ng Sn g<sup>-1</sup>) (Pinochet *et al.*, 2009).

Por outro lado, os índices de butilestânicos degradados (IBD) calculados para cada amostra, sugerem a ocorrência de TBT oriundo de aportes antigos e recentes nesses estuários. Essa observação também foi feita por outros estudos realizados na América do Sul (Oliveira *et al.*, 2010; Pinochet *et al.*, 2009) e permite concluir que uma possível redução dos níveis de TBT está ocorrendo devido a uma atenuação natural das concentrações aliada a um redução dos novos aportes. Esses resultados são provavelmente uma consequência do banimento mundial das tintas a base de TBT imposto pela Organização Marítima Internacional em setembro de 2008 (IMO, 2008). Dessa forma é esperado que os níveis de TBT em áreas costeiras sul-americanas diminuam drasticamente na próxima década.

Adicionalmente, os níveis de irgarol e diuron detectados no Golfo de Guayaquil, estuário da Lagoa dos Patos e Golfo Nuevo sugerem um baixo risco para as comunidades locais, visto que as concentrações detectadas para esses compostos foram, pelo menos, uma ordem de grandeza, menores que as concentrações capazes de gerar efeito para maioria dos representantes da biota aquática (Mochida & Fujii, 2009; Zhang *et al.*, 2008; Berard *et al.*, 2003). Considerando que o uso de irgarol e diuron já está proibido em muitos países (ex.: Europa) em razão dos elevados níveis ambientais encontrados ( $\leq 1011 \text{ ng g}^{-1}$  no Mar Báltico e  $\leq 6742 \text{ ng g}^{-1}$  na baía de Southampton, respectivamente) (Thomas & Brooks, 2010), é possível que os baixos níveis observados no presente estudo sejam uma consequência dessa proibição aliada ao menor tempo de persistência desses compostos nos sedimentos (Thomas & Langford, 2009; Lam *et al.*, 2006). Dessa forma, como existem 16 diferentes biocidas homologados para utilização em tintas anti-incrustantes de terceira geração, é provável que outros compostos (que não o irgarol e diuron), estejam sendo mais frequentemente utilizados em revestimentos anti-incrustantes na América do Sul. Portanto, é fundamental a realização de investigações que permitam determinar quais biocidas de terceira geração estão substituindo o TBT nessa região.

Ainda não existem métodos analíticos capazes de determinar simultaneamente os 16 novos compostos biocidas homologados pela Organização Marítima Internacional (IMO) para uso em tintas anti-incrustantes de terceira geração (Fernandez & Pinheiro, 2007). Assim como também não estão disponíveis no Brasil, técnicas capazes de identificar os biocidas que integram um determinado sistema de revestimento ou partículas de tinta. Essas limitações tecnológicas, por sua vez, inviabilizam, por exemplo, medidas de fiscalização portuária, as quais seriam necessárias para a correta aplicação da convenção para sistemas anti-incrustantes da IMO. Além disso, sabe-se

que algumas tintas anti-incrustantes utilizam uma combinação de até 4 diferentes biocidas no mesmo produto (Okamura & Mieno, 2006a). Desta forma, é fundamental conhecer os possíveis efeitos ecotoxicológicos resultantes dessas misturas sobre organismos nativos de zonas costeiras sul-americanas. Essa informação, aliada as avaliações de eficiência da própria tinta, seria muito útil na definição dos produtos que apresentam a melhor relação custo-benefício no que tange as questões ambientais.

Com base nos resultados apresentados verificou-se que a contaminação por COE encontra-se difundida pela região costeira sul-americana, sendo intimamente relacionada a áreas onde ocorre fluxo de embarcações (portos, marina e estaleiros). Comparativamente, os níveis de TBT e derivados detectados na costa da América do Sul são em geral, menores do que os reportados em estudos realizados na Europa, Ásia e América do Norte (Arai & Harino, 2009; Nakanishi & Nishikawa, 2009). Entretanto, existem no continente “*hot spots*” de contaminação por TBT, como a baía de Paranaguá (Brasil), baía de Guanabara (Brasil), região portuária de Mar del Plata (Argentina), Bahía Blanca (Argentina), Puerto Deseado (Argentina), Baía de São Vicente (Chile) e região portuária de Callao (Peru). Porém, estas podem não ser as únicas áreas altamente contaminadas no continente, já que as regiões costeiras da Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Uruguai e norte do Chile não possuem nenhuma informação quanto aos níveis ambientais de biocidas de segunda e terceira gerações. Essa situação é particularmente preocupante visto que, na maioria dessas áreas, existem portos estrategicamente importantes para economia sul-americana.

Adicionalmente, considerando os níveis de organoestânicos em sedimentos observados no golfo de Guayaquil, estuário da Lagoa dos Patos e golfo Nuevo, bem como, os dados disponíveis na literatura especializada (Oliveira *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009; Pinochet *et al.*, 2009), foi possível verificar a existência de indícios que

apontam para ocorrência de aportes antigos ou de uma rápida degradação do TBT aliado a continuidade de aportes recentes. Como os metabólitos apresentam, na maioria das vezes, concentrações muito maiores do que o composto original (TBT) há um indício de que esteja ocorrendo uma redução nos aportes atuais em decorrência, provavelmente, da implementação de legislações locais e do banimento mundial imposto pela IMO.

A utilização do imposex como um indicador da contaminação por organoestânicos mostrou-se uma estratégia, de baixo custo, eficiente e de fácil aplicação, tendo sido utilizada com êxito nas costas leste e oeste da América do Sul. Devido sua grande versatilidade, essa ferramenta tem sido reconhecida e utilizada por programas governamentais de monitoramento da contaminação por COE na Europa (Harding & Davies, 2000).

Na América do Sul, entretanto, ainda não existem esses tipos de programas de monitoramento, os quais poderiam ser extremamente úteis visto que, as áreas atualmente impactadas por organoestânicos e, conseqüentemente, onde se verifica a ocorrência de imposex, serão as mesmas áreas futuramente atingidas pelo uso de anti-incrustantes de terceira geração. Adicionalmente a realização de estudos dessa natureza poderiam viabilizar estimativas quanto persistência desse passivo ambiental em áreas costeiras.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A costa da América do Sul encontra-se atualmente impactada de forma difusa pela utilização de tintas anti-incrustantes contendo TBT, sendo os terminais portuários, as marinas e os estaleiros localizados ao longo do litoral, as principais fontes desse composto para o ambiente, visto que, a ocorrência de imposex em populações de gastrópodes está intimamente relacionada a essas áreas;
- Considerando os dados disponíveis, os “hotspots” da contaminação por COE na América do Sul são: baía de Paranaguá (Brasil), baía de Guanabara (Brasil), região portuária de Mar del Plata (Argentina), Bahia Blanca (Argentina), Puerto Deseado (Argentina), baía de São Vicente (Chile), região portuária de Callao (Perú);
- Os níveis de contaminação por COE, bem como o impacto produzido pela sua utilização continuam desconhecidos para zonas costeiras da Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Uruguai e norte do Chile;
- As espécies de muricídeos *Thais kiosquiformis*, *Thais biserialis*, *Thais brevidentata*, *Thais chocolata* e *Acanthina monodon* apresentam grande potencial para serem incorporadas como ferramentas em programas multinacionais de monitoramento da contaminação por COE na costa oeste da América do Sul, da mesma forma que *Stramonita haemastoma* se mostrou eficaz na costa leste da América do Sul;
- Os sedimentos do Golfo de Guayaquil (Equador), Golfo Nuevo (Argentina) e estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) encontram-se moderadamente impactados pela contaminação por TBT oriundo de sistemas anti-incrustantes, havendo,



entretanto, indícios de aportes antigos (exceto para o Golfo Nuevo), ou de uma rápida degradação de TBT, associados a aportes recentes indicando que esta pode ser uma tendência geral para os sistemas aquáticos sul-americanos;

- Irgarol 1051 e diuron não parecem ser os biocidas preferenciais presentes nos novos sistemas anti-incrustantes que substituem as tintas de segunda geração na América do Sul, entretanto os níveis ambientais de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração permanecem desconhecidos para toda a costa da América do Sul.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme mencionado anteriormente, novas questões pertinentes ao impacto produzido pelo uso de sistemas anti-incrustantes na América do Sul surgiram durante o desenvolvimento deste estudo. Com relação às tintas a base de TBT (segunda geração) é importante enfatizar que tanto os níveis ambientais desses compostos como a ocorrência de imposex, permanecem desconhecidos para zonas costeiras da Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Uruguai e norte do Chile. Considerando que em muitas dessas regiões existem terminais portuários estrategicamente importantes para economia sul-americana, é importante que estudos sejam conduzidos nestas regiões a fim de preencher essa lacuna e orientar estratégias reguladoras eventualmente necessárias.

A fim de tornar comparáveis os resultados obtidos pela utilização do imposex como sentinela da contaminação por COE, devem ser realizados estudos experimentais ou de campo objetivando a comparação do grau de sensibilidade das espécies utilizadas em programas de avaliação ou monitoramento.

Quanto aos biocidas utilizados em anti-incrustantes de terceira geração é fundamental o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de identificar e quantificar simultaneamente os 16 compostos homologados pela IMO, bem como avaliar os efeitos ecotoxicológicos de combinações dessas substância e das próprias tintas sobre organismos nativos. Além disso, uma avaliação de custo-benefício sobre as principais tintas anti-incrustantes comercializadas na América do Sul contribuiria substancialmente para nortear escolhas ambientalmente responsáveis por parte da construção naval.

Finalmente, a realização de avaliações (química e biológica) que permitam verificar os níveis de COE e imposex nas áreas onde estes são ainda desconhecidos e a

escolha de pontos estratégicos para obtenção de séries temporais desses parâmetros, são condições fundamentais para proposição de planos de gerenciamento das áreas sensíveis ao impacto provocado pelo uso de tintas anti-incrustantes na América do Sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, R.T. and Dance (1982). Compendium of Seashells. *Odyssey Publications*, Perth. 411 p.
- Abidli, S., Lahbib, Y., and Trigui El Menif, N. (2010). Imposex and butyltin concentrations in *Bolinus brandaris*; (Gastropoda: Muricidae) from the northern Tunisian coast. *Environmental Monitoring and Assessment* 1-10.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., and de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* **59**, 2-20.
- Arai, T. and Harino, H. (2009). Contamination by Organotin Compounds in Asia. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 61-74.
- Berard, A., Dorigo, U., Mercier, I., Becker-van Slooten, K., Grandjean, D., and Leboulanger, C. (2003). Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* **53**, 935-944.
- Castro, I.B. (2005). Estudo do Imposex em Muricídeos do Gênero *Stramonita* (Mollusca: Gastropoda) no Nordeste do Brasil. mestrado,
- Castro, I.B., Bemvenuti, C.E., and Fillmann, G. (2007a). Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology* **2**, 73-79.
- Castro, I.B., de Meirelles, C.A.O., Matthews-Cascon, H., Rocha-Barreira, C.D., Penchaszadeh, P., and Bigatti, G. (2008). Imposex in Endemic Volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). *Brazilian Archives of Biology and Techinology* **51**, 1065-1069.
- Castro, I.B., Lima, A.F.A., Braga, A.R.C., and Rocha-Barreira, C.A. (2007b). Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. *Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology* **2**, 81-91.
- Castro, I.B., Perina, F.C., and Fillmann, G. (*In Press*). Review of organotins contamination in South America. *Environmental Monitoring and Assessment*.
- Castro, I.B., Ribeiro-Ferreira, V., Lima, A.F.A., Meirelles, C.A.O., and Rocha-Barreira, C.A. (2007c). Imposex in three prosobranch species from Ilha do Japonês, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Thalassas* **23**, 37-42.
- CESBRA. Chemical products marketed by CESBRA. <http://www.cesbra.com.br/site/quimicos.asp> . 2011.  
Ref Type: Internet Communication
- Choi, M., Moon, H.B., Yu, J., Eom, J.Y., and Choi, H.G. (2010). Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels from Busan Harbor of Korea

- Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **58**, 394-402.
- Cob, Z., Arshad, A., Bujang, J., and Ghaffar, M. (2010). Description and evaluation of imposex in *Strombus canarium* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Strombidae): a potential bio-indicator of tributyltin pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 1-8.
- CONAMA (2005). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 357, Diário Oficial da União, Brazil, 63 p.
- Delucchi, F., Tombesi, N.B., Freije, R.H., and Marcovecchio, J.E. (2006). Butyltin compounds in sediments of the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* **132**, 445-451.
- DPMA. Prefectura Naval Argentina. Ordenanza 4/98 Tomo 6, Régimen para la proteccion del medio ambiente. Anexo 1. 1998.  
Ref Type: Statute
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* **140-141**, 353-365.
- Fernandez, M.A. (2006). Brazilian Experience on TBT Pollution: Lessons for Future Studies. *Journal of Coastal Research* **SI 39**, 1336-1339.
- Fernandez, M.A. and Pinheiro, F. (2007). New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. *Int.J.Environ.Health* **1**, 427-448.
- Gipperth, L. (2009). The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. *Journal of Environmental Management* **90**, S86-S95.
- Harding, M.J.C. and Davies, I.M. (2000). A field evaluation of international monitoring guidelines for the biological effects of tributyltin. *Journal of Environmental Monitoring* **2**, 404-409.
- Huaquin, L.G., Osorio, C., Verdugo, R., and Collado, G. (2004). Morphological changes in the reproductive system of females *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda : Muricidae) affected by imposex from the coast of central Chile. *Invertebrate Reproduction & Development* **46**, 111-117.
- IMO (2008). Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. International Maritime Organization, United Kingdom,
- Kebarle, P. and Tang, L. (1993). From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **65**, 972A-986A.
- Keen, A.M. and McLean, J.M. (1971). Sea Shells of Tropical West America; Marine Mollusks from Baja California to Peru. *Stanford University Press*, Stanford. 1064 p.

- Konstantinou, I.K. and Albanis, T.A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* **30**, 235-248.
- Kotrikla, A. (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management* **90**, S77-S85.
- Lam, K.H., Wai, H.Y., Leung, K.M.Y., Tsang, V.W.H., Tang, C.F., Cheung, R.Y.H., and Lam, m.H.W. (2006). A study of the partitioning behavior of Irgarol-1051 and its transformation products. *Chemosphere* **64**, 1177-1184.
- Ludgate, J. (1987). Economic and Technological Impact of TBT Legislation on the USA Marine Industry. *Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference*. **4**, 1309-1313.
- Mair, J., Sánchez, E.M., and Padilla, M.C. (2002). Manual de campo de los onvertebrados bentónicos marinos: Moluscos, Crustáceos y Equinodermos de la zona litoral Ecuatoriana. *Universidad de Guayaquil y Heriot-Watt University*, Guayaquil. 110 p.
- Mochida, K. and Fujii, K. (2009). Further Effects of Alternative Biocides on Aquatic Organisms. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 383-393.
- Morabito, R., Chiavarini, S., and Cremisini, C. (1995). Speciation of organotin compounds in environmental samples by GC-MS. In: Ph. Quevauviller, E.A. Maier, and B. Griepink (eds.), *Quality Assurance for Environmental Analysis*. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 435-464.
- Morton, B. (2009). Recovery from imposex by a population of the dogwhelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda: Caenogastropoda), on the southeastern coast of England since May 2004: A 52-month study. *Marine Pollution Bulletin* **58**, 1530-1538.
- Nakanishi, T. and Nishikawa, J.i. (2009). Genetic Impacts of Organotin Compounds. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 221-233.
- NORMAM/23 (2007). Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações - NORMAM/23. Marinha do Brasil, Rio de Janeiro,
- Okamura, H. and Mieno, H. (2006b). Present Status of Antifouling Systems in Japan: Tributyltin Substitutes in Japan. In: O. Hutzinger (eds.), *Water Pollution*. Springer, New York. pp. 201-212.
- Okamura, H. and Mieno, H. (2006a). Present Status of Antifouling Systems in Japan: Tributyltin Substitutes in Japan. In: I.K. Konstantinou (eds.), *Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 201-212.

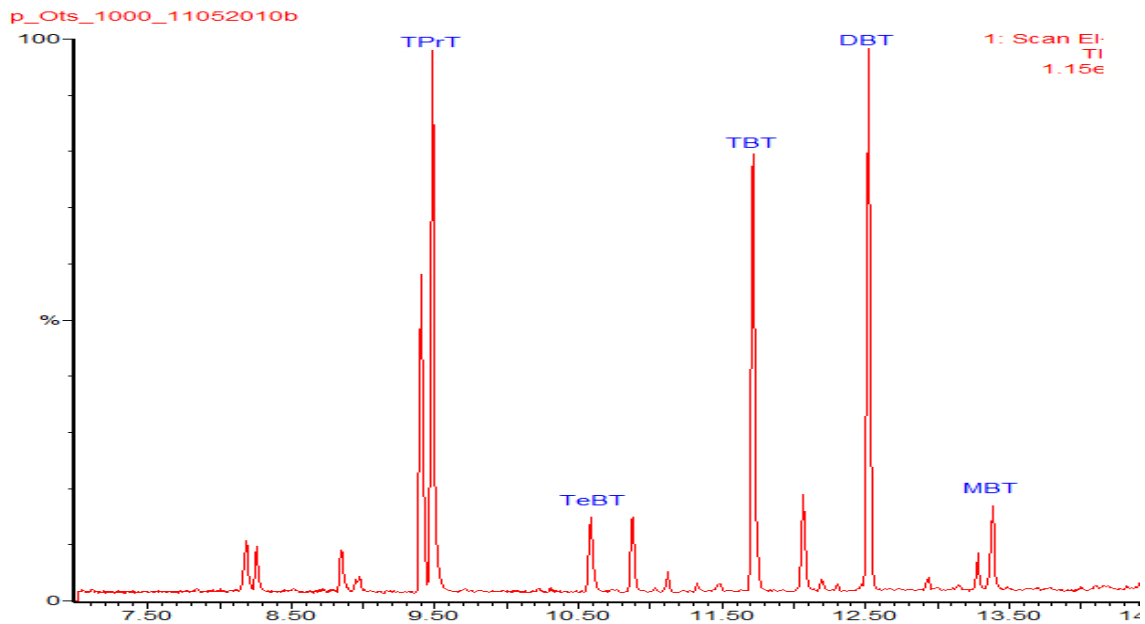
- Oliveira, C.R., Santos, D.M., Santos Madureira, L.A., and Marchi, M.R.R. (2010). Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. *Journal of Hazardous Materials* **181**, 851-856.
- Pinochet, H., Tessini, C., Bravo, M., Quiroz, W., and De Gregori, I. (2009). Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay, Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* **155**, 341-353.
- Readman, J. (2006a). Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends. In: I.K. Konstantinou (eds.), Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides. *Springer-Verlag*, Berlin. pp. 1-15.
- Readman, J. (2006b). Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends. In: O. Hutzinger (eds.), Water Pollution. *Springer*, New York. pp. 1-15.
- Rossato, M., Sartório, A., Castro, I.B., Fillmann, G., and Pinho, G. Imposex induction and mechanism of toxicity from TBT injections in *Stramonita haemastoma*. 2011. Ref Type: Unpublished Work
- Ruiz, J.M., Barreiro, R., Couceiro, L., and Quintela, M. (2008). Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. *Chemosphere* **73**, 1253-1257.
- SANCO (2009). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analyses in food and feed. 10684, European Commission, 53 p.
- Santos, D.M., Araújo, I.P., Machado, E.C., Carvalho-Filho, M.A.S., Fernandez, M.A., Marchi, M.R.R., and Godoi, A.F. (2009). Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. *Marine Pollution Bulletin* **58**, 1926-1931.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., and Imboden, D.M. (1994). Environmental Organic Chemistry. *Wiley Interscience*, New York.
- Sonak, S. (2009). Implications of organotins in the marine environment and their prohibition. *Journal of Environmental Management* **90**, S1-S3.
- Sonak, S., Pangam, P., Giriyan, A., and Hawaldar, K. (2009). Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. *Journal of Environmental Management* **90**, S96-S108.
- Sousa, A., Laranjeiro, F., Takahashi, S., Tanabe, S., and Barroso, C.M. (2009). Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* **77**, 566-573.
- Tang, C.H. and Wang, W.H. (2007). Optimization of an analytical method for determining organotin compounds in fish tissue by base-hydrolysis pretreatment and simultaneous ethylation-extraction procedures. *Analytica Chimica Acta* **581**, 370-376.

- Thomas, K.V. and Brooks, S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* **26**, 73-88.
- Thomas, K.V. and Langford, K.H. (2009). The Analysis of Antifouling Paint Biocides in Water, Sediment and Biota. In: T. Arai, H. Harino, M. Ohji, and W.J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, Tokyo. pp. 311-327.
- Wade, T.L., Sweet, S.T., and Klein, A.G. (2008). Assessment of sediment contamination in Casco Bay, Maine, USA. *Environmental Pollution* **152**, 505-521.
- Wilson, S.P. (2008). Flags of convenience shield polluters in battle to protect seas. *Nature* **455**, 1029.
- Yebra, D.M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004a). Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75-104.
- Yebra, D.M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004b). Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75-104.
- Zhang, A.Q., Leung, K.M.Y., Kwok, K.W.H., Bao, V.W.W., and Lam, m.H.W. (2008). Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. *Marine Pollution Bulletin* **57**, 575-586.

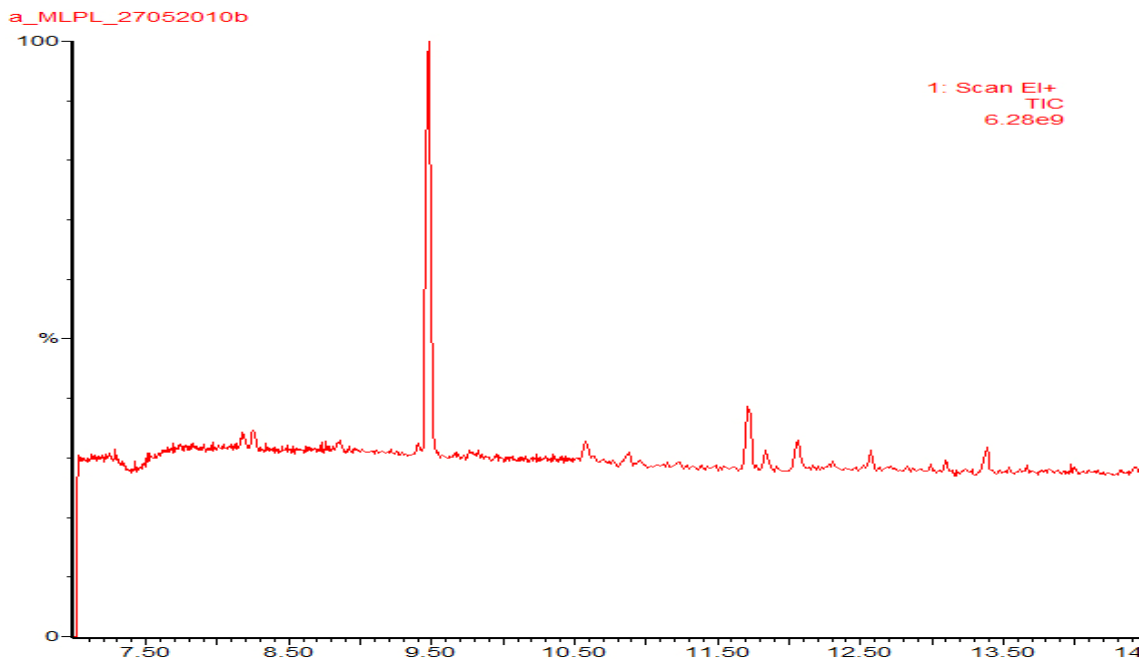


## ANEXOS

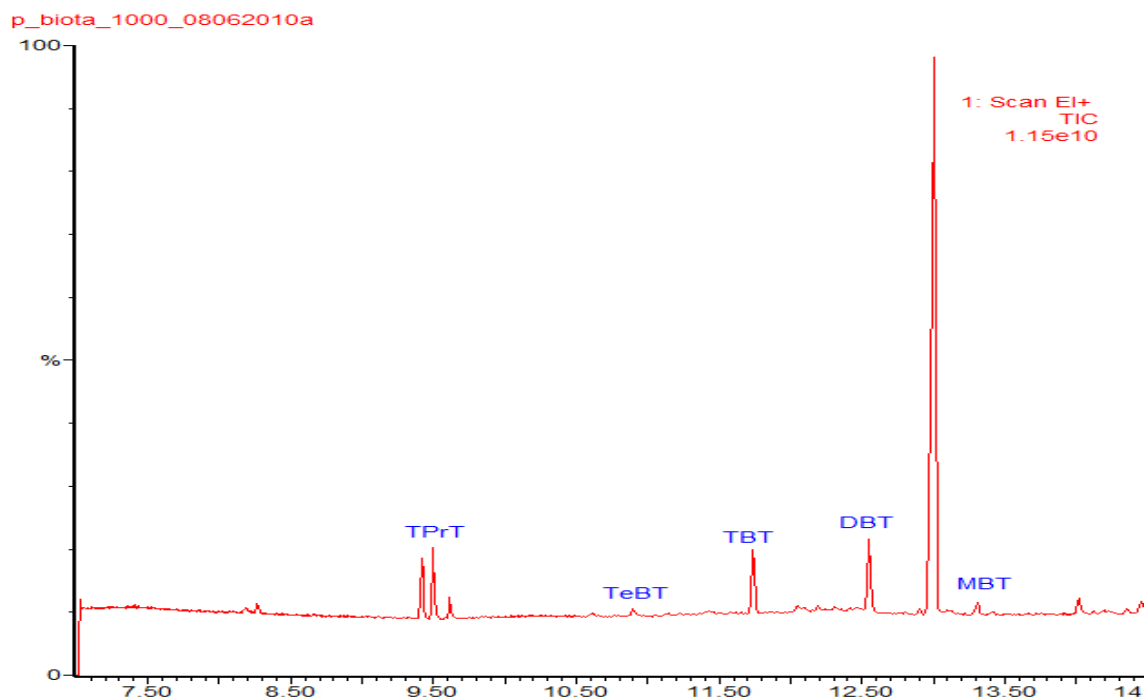
### CROMATOGRAMAS



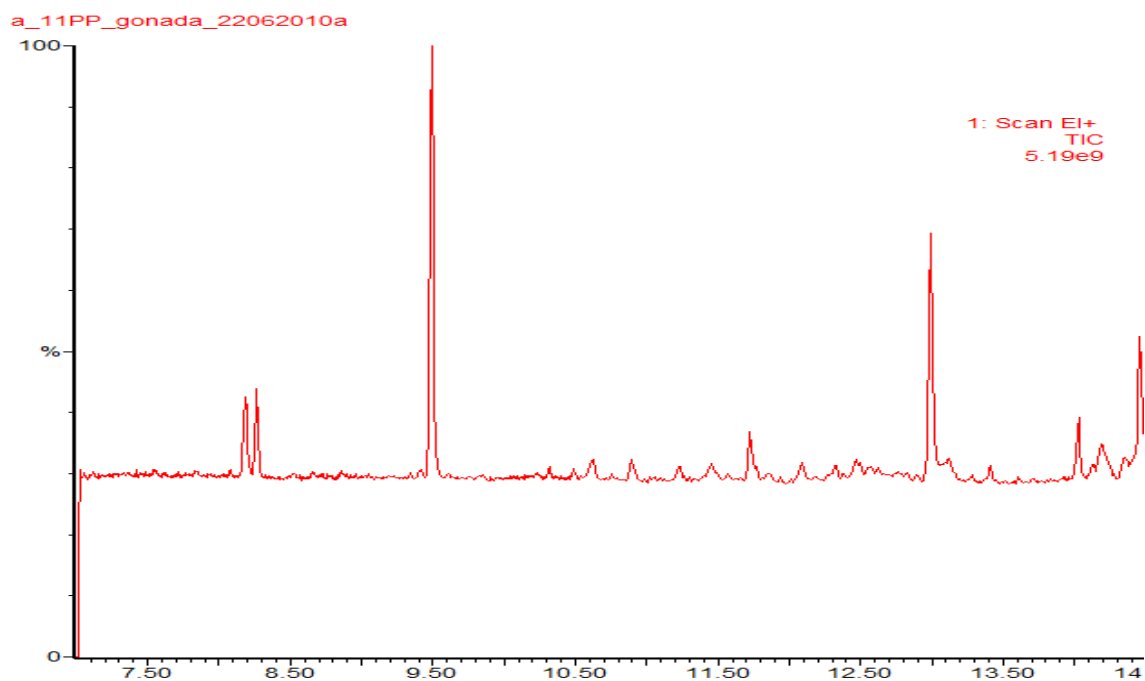
Cromatograma de padrões de Organoestânicos fortificados na matriz sedimentos. Concentração 1000 ng Sn g<sup>-1</sup>



Cromatograma típico de uma amostra de sedimentos analisada quanto a presença de organoestânicos.



Cromatograma de padrões de Organoestânicos fortificados na matriz tecido de mexilhão. Concentração 1000 ng Sn g<sup>-1</sup>

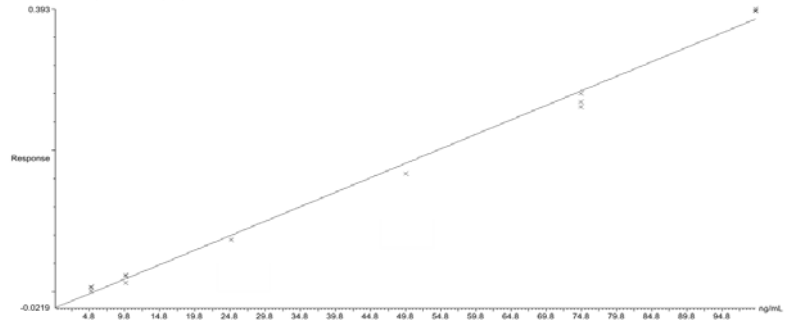


Cromatograma típico de uma amostra de biota analisada quanto a presença de organoestânicos.

# CURVAS ANALÍTICAS

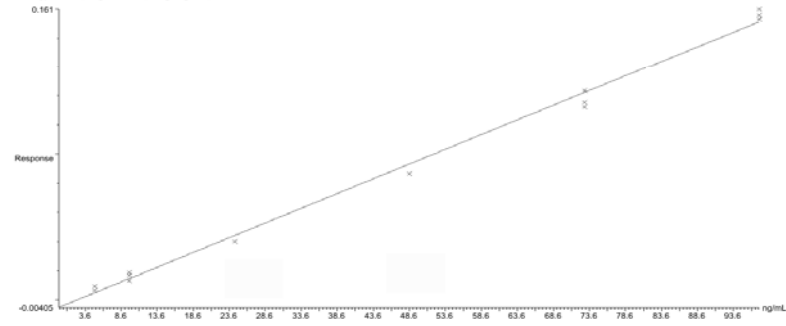
Compound 3 name: TBT  
 Correlation coefficient:  $r = 0.997508$ ,  $r^2 = 0.995023$   
 Calibration curve:  $0.00402656 \cdot x + -0.0216595$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

, 09-Jun-2010 + 12:39:30



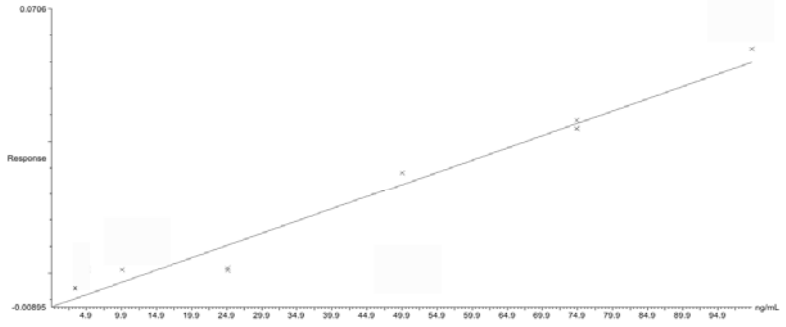
Compound 4 name: DBT  
 Correlation coefficient:  $r = 0.997595$ ,  $r^2 = 0.995195$   
 Calibration curve:  $0.00162608 \cdot x + -0.00404864$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

, 09-Jun-2010 + 12:39:30



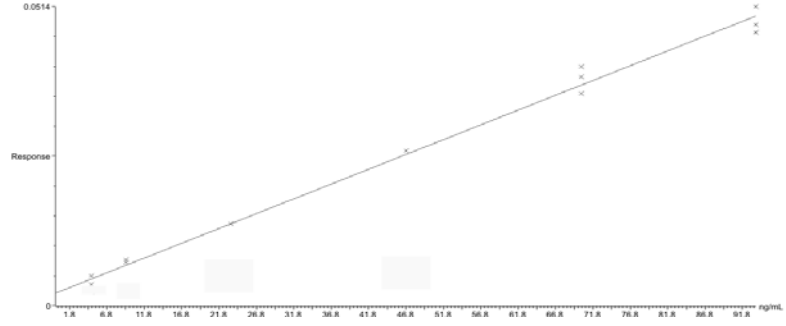
Compound 5 name: TPT  
 Coefficient of Determination: 0.945841  
 Calibration curve:  $0.00064594 \cdot x + -0.00894503$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

, 09-Jun-2010 + 12:39:30



Compound 5 name: MBT  
 Correlation coefficient:  $r = 0.996030$ ,  $r^2 = 0.992076$   
 Calibration curve:  $0.000268027 \cdot x + 0.00219035$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

, 09-Jun-2010 + 12:39:30



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (em português)

ATP - Trifosfato de Adenosina  
BT - Benzotiazol  
CE - Concentração Efetiva  
CE<sub>50</sub> - Concentração Efetiva Média  
CG - Cromatografia a Gás  
CG/DCE - Cromatografia a Gás com Detector de Captura de Elétrons  
CG/EM - Cromatografia a Gás com Detecção por Espectrometria de Massas  
CL - Concentração Letal  
CL<sub>50</sub> - Concentração Letal Média  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CLAE/DAD - Cromatografia de Fase Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos  
CL/EM - Cromatografia Líquida com Detector de Espectrometria de Massas  
CL/IQPA/EM - Cromatografia Líquida com Ionização Química a Pressão Atmosférica  
COE - Composto Organoestânico  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
COT - Carbono Orgânico Total  
CP - Cobre Piritiona  
Cu<sub>2</sub>O - Óxido Cuproso  
CuSCN - Tiocianato de Cobre  
DBT - Dibutilestanho  
DCE - Detector de Captura de Elétrons  
DCOIT - 4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona  
DFC - Detector Fotométrico de Chama  
DMSA - N,N-Dimetilaminosulfanilida  
DPB - Hidróxido de Difetilborano  
DPMA – Diretoria de Portos e Marinha da Argentina  
DPT - Difetilestanio  
EFS - Extração em Fase Sólida  
ELL - Extração líquido-líquido  
EM - Espectrometria de Massas

HCl - Ácido Clorídrico  
IDB - Índice de Butilestânicos Degradados  
IMO - Organização Marítima Internacional  
LQ - Limite de Quantificação  
MBT - Monobutilestano  
MPT - Monofenilestano  
MEFS - Microextração em Fase Sólida  
M. M.- Massa Molecular  
MPB - Hidróxido de Fenilborano  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NORMAM- Norma da autoridade marítima brasileira para sistemas anti-incrustantes  
P.V. - Pressão de Vapor  
P.E. - Ponto de Ebulição  
S. A. - Solubilidade em Água  
TBT - Tributilestano  
TCMTB - 2-(tiocianometiltio) benzotiazol  
TCMS - (2,3,3,6-tetracloro-4-metilsulfonil) piridina  
TPBP - Trifenilborano Piridina  
TPrT - Tripropilestano  
TPT - Trifenilestano  
USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos  
UV - Ultravioleta  
ZP - Zinco Piritona

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (em inglês)

AFS – Antifouling System  
BTs – Butyltin Compounds  
DBT – Dibutyltin  
BDI – Butyltin Degradation Index  
DPhT – Diphenyltin  
FPD - Flame Photometric Detector  
FPL - Female Penis Length  
FPLI - Female Penis Length Index  
GC - Gas Chromatography  
GC/MS – Gas Chromatography Coupled Mass Spectrometry  
GPS- Global Position System  
HCl – Chloride Acid  
I% - Imposex Percentage  
LOD – Detection Limit  
LOQ – Quantification Limit  
MBT – Monobutyltin  
MEPC - Marine Environment Protection Committee  
MgCl – Magnesium Chloride  
MPhT – Monophenyltin  
MPL - Male Penis Lengths  
NaCl – Sodium Chloride  
IMO – International Maritime Organization  
OTs - Organotin Compounds  
PFPD - Pulsed Flame Photometric Detector  
PL – Penis Length  
PTFE - Polytetrafluoroethylene  
RPLI – Relative Penis Length Index  
RPSI – Relative Penis Size Index  
RSD – Relative Standard Deviation  
SL - Shells Lengths  
TeBT - Tetrabutyltin  
TBT – Tributyltin

TOC – Total Organic Carbon  
TPhT – Triphenyltin  
TPrT – Tripropyltin  
 $t_R$  – Retention time  
 $t_{RR}$  – Relative Retention Time  
UV - Ultraviolet  
VDSI – Vas Deferens Sequence Index

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I (Artigo I)

- Figura 1: Areas assessed for imposex in gastropods ( $\nabla$ ) and, organotin contamination in sediments ( $\blacktriangleleft$ ) and marine mammals ( $\blacktriangle$ ) of the South American coast.
- Figura 2: Highest butyltin concentrations ( $\text{ng Sn g}^{-1} \text{ dw}$ ) detected in surface sediments of South America in comparison to other worldwide determinations.
- Figura 3: Relative composition of butyltin compounds reported for sediments of South American coastal areas.
- Figura 4: Butyltin concentration ( $\text{ng g}^{-1} \text{ wet wt}$ ) in liver of different dolphins reported for South American coastal areas (\*) and several other regions of the world.

### Capítulo II

- Figura 1. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled at Paranaguá Bay (PR).
- Figura 2. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled at Babitonga Bay (SC).
- Figura 3. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled nearby the Itajaí harbor and adjacent coastal area.
- Figura 4. Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled nearby the Rio Grande harbor and adjacent coastal area.

### Capítulo III

- Figura 1: Typical chromatogram of Butyltin compounds in sediments and mussel tissues matrix (spiked and blank). TPrT, TeBT (internal standard), TBT, DBT and MBT. TeBT concentration =  $100 \text{ ng Sn g}^{-1}$ , other analites =  $1000 \text{ ng Sn g}^{-1}$ .

### Capítulo IV (Artigo I)



- Figura 1: Sampling sites (S) of sediments and gastropods in the Ecuadorian coastal shore. (+) surface sediments; (●) *Thais brevidentata*; (▲) *Thais biserialis*; (○) *Thais kiosquiformis*.
- Figura 2: Comparative analysis of imposex indices (RPLI, FPLI and VDSI) on *Thais brevidentata*, *Thais biserialis* and *Thais kiosquiformis*, whenever found in the same site.

#### Capítulo IV (Artigo II)

- Figura 1: Sampled sites along influence areas of Callao and Chimbote harbors from Peruvian coast.
- Figura 2: Correlation analyses between SL and PL in *Thais Chokolata* from Peru.

#### Capítulo V

- Figura 1: Sampled sites in southern Brazilian harbors.
- Figura 2: Temporal differences of male penis length and female penis length between 2006 and 2010. Error bars denote stand deviation. Significant differences are marked. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .
- Figura 3: Temporal comparisons of VDSI and FPL values between 2006 and 2010. Error bars denote stand deviation. Significant differences are marked. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

#### Capítulo VI

- Figura 1: Localização dos três estuários estudados na América do Sul
- Figura 2: Estações de amostradas no Golfo de Guayaquil (Equador) indicando as concentrações de TBT, DBT e MBT (barras) e presença de Irgarol 1051 (\* negro) e Diuron (\* branco).
- Figura 3: Estações de amostradas no Estuário da Lagoa dos Patos (Brasil) indicando as concentrações de TBT, DBT e MBT (barras) e presença de Irgarol 1051 (\* negro) e Diuron (\* branco).
- Figura 4: Estações de amostradas no Golfo Nuevo (Argentina) indicando as concentrações de TBT, DBT e MBT (barras) e presença de Irgarol 1051 (\* negro) e Diuron (\* branco).
- Figura 5: Análise de componentes principais para concentrações de TBT, DBT e MBT e a presença ou ausência de Irgarol 1051 e Diuron nas amostras obtidas no estuário da Lagoa dos Patos.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I (Artigo I)

- Tabela 1: Prosobranch species from South American coastal areas which imposex was already reported.
- Tabela 2: Overview of restraints concerning the use of TBT (Modified from IMO, 2000).

### Capítulo I (Artigo II)

- Tabela 1: Grupo de 16 biocidas homologados pela IMO para utilização em tintas anti-incrustantes.
- Tabela 2: Principais propriedades físico-químicas dos 16 biocidas usados em anti-incrustantes de Terceira geração. (**S.A.**, solubilidade em água; **M.M.**, massa molecular; **P.V.**, Pressão de vapor; **P.E.**, Ponto de ebulição).
- Tabela 3: Toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes de terceira geração sobre diversos grupos de organismos. (**CE**, concentração efetiva, **CL** concentração letal)

### Capítulo II

- Tabela 1. Position (latitude and longitude) of the sampling stations and their distance from the main harbor.

### Capítulo III

- Tabela 2: Retention time ( $t_R$ ), relative retention time ( $t_{RR}$ ) and monitored ion.
- Tabela 2: Parameters of the analytical curve in pure solvent $_{(sol)}$ , sediment matrix $_{(sed)}$  and mussel tissues matrix $_{(bio)}$  equation, matrix effect (% ME), square of regression coefficient ( $R^2$ ), instrumental limits of detection ( $LOD_i$ ), instrumental limits of quantification ( $LOQ_i$ ), sediment method limits of quantification ( $LOQ_{sed}$ ) and biota method limits of quantification ( $LOQ_{bio}$ ).
- Tabela 3: Recovery, repeatability ( $RSD_r$ ) and intermediate precision ( $RSD_{ip}$ ), of the method, for mixture of TPrT, TBT, DBT and MBT sediment spiked at different levels (n=9).

- Tabela 4: Recovery, repeatability ( $RSD_r$ ) and intermediate precision ( $RSD_{ip}$ ), of the method, for mixture of TPrT, TBT, DBT and MBT in mussel tissue spiked at different levels (n=9).

#### Capítulo IV (Artigo I)

- Tabela 1: Percentage of fine sediments, total organic carbon (%TOC), butyltin concentrations ( $ng\ Sn\ g^{-1}\ dw$ ) and butyltin degradation indexes in the sediments sampled at the Gulf of Guayaquil.
- Tabela 2: Butyltin concentrations ( $ng\ Sn\ g^{-1}\ dw$ ) in different sediments of South American environments.
- Tabela 3: Sample size ( $n$ ), male/female proportion ( $\sigma/\rho$ ), shell size (mm) and Imposex indices (I%, RPLI, FPLI, VDSI) obtained for *Thais biserialis*, *Thais brevidentata* and *Thais kiosquiformis* collected at different sites of Ecuadorian coastal shore.

#### Capítulo IV (Artigo II)

- Tabela 1: Shell lengths (SL), Male and Female Penis lengths (MPL and FPL), relative penis length index (RPLI), Vas deferens sequence index (VDSI), RPLI and FPL standardized by SL ( $RPLI_{stand}$  and  $FPL_{stand}$ ) obtained to *Stramonita chocolata* in two Peruvian harbors. (sd) standard deviation, ( $n$ ) number of analyzed specimens.

#### Capítulo V

- Tabela 1: Shell length and Imposex levels obtained to *Stramonita haemastoma* in 2006 and 2010. (sd) standard deviation, ( $n$ ) number of analyzed specimens, (I %) imposex frequency, (VDSI) vas deferens sequence index, (FPL) average of female penis length and (RPLI) relative penis length index.
- Tabela 2: Concentrations ( $ng\ Sn\ g^{-1}\ dw$ ) and percentage of organotin compounds in *S. haemastoma* female bodies from 4 southern Brazilian harbors (2010 campaign). < LOD (not detected).

#### Capítulo VI

- Tabela 1: Carbono Orgânico Total (% COT), concentrações de Irgarol ( $ng\ g^{-1}$ ), Diuron ( $ng\ g^{-1}$ ), butilestânicos (TBT, DBT e MBT ( $ng\ Sn\ g^{-1}$ )) e Índices de degradação de Butilestânicos (IDB) obtidos para o Golfo de Guayaquil, estuário da Lagoa dos Patos e Golfo Nuevo.
- Tabela 2: Concentrações de TBT, DBT e MBT obtidas em diversos estudos realizados na América do Sul em comparação com os resultados apresentados no presente estudo.

## **PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO:**

### **Artigos completos publicados:**

1. Lima-Verde, Flávia Bezerra; Castro, Í. B.; de Almeida Rocha-Barreira, Cristina. Imposex occurrence in *Nassarius vibex* from South America: a potential bioindicator in estuarine environments. *Marine Biodiversity Records*, v. 3, p. e30, 2010.
2. Castro, Ítalo Braga de; Meirelles, Carlos Augusto Oliveira de; Matthews-Cascon, Helena ; Rocha-Barreira, C. A. ; Penchaszadeh, Pablo ; Bigatti, G. . Imposex in endemic volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 1065-1069, 2008.
3. Meirelles, Carlos A.O.; Castro, Ítalo B.; Pinheiro, Jully C.L.. A first record of biphallia in imposed female of *Leucozonia nassa* (Caenogastropoda: Fasciolariidae). *Marine Biodiversity Records*, v. 1, p. e39, 2008.
4. Castro, Í. B.; Rocha-Barreira, C. A. ; Queiroz, L. R. . Compostos Orgânicos de Estanho: Efeitos sobre a Fauna Marinha Uma Revisão. *Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza*, v. 40, p. 96-112, 2007.
5. Castro, Í. B.; Ribeiro-Ferreira, V. P.; Lima, A. F. A. ; Meirelles, C. A.; Rocha-Barreira, C. A. . Imposex in three prosobranch species from Ilha do Japonês, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Thalassas (Santiago de Compostela)*, v. 23, p. 37-42, 2007.
6. Castro, I.B.; Bemvenuti, C.E ; Fillmann, G.. Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *Journal Of The Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2007, p. 73-79, 2007.

7. Queiroz, L.R.; Castro, I.B.; Rocha-Barreira, C.A.. New Imposex Development Index (IDI) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): A Transplantation Experiment in the Brazilian Northeast. *Journal of The Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, p. 249-256, 2007.

8. Castro, I.B.; Alves de Lima, A.F. ; Braga, A.R.C. ; Rocha-Barreira, C.A. . Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. *Journal of The Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, p. 81-91, 2007.

#### **Artigos completos aceitos para publicação:**

1. Castro, Í. B.; Alves, E.W. ; Fillmann, G.. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova* (Impresso), 2011.

2. Castro, Í. B.; Perina, F. C. ; Fillmann, G. Review of organotins contamination in South America. *Environmental Monitoring and Assessment* (Print), 2011.

3. Castro, Í. B.; Osorio, M.F.A ; Costa, P.G. ; Fillmann, G. Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (Print), 2011.

4. Castro, Í. B.; Rossato, M. ; Fillmann, G. Imposex reduction and reminiscent butyltin contamination in Southern Brazilian harbors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011.

#### **Trabalhos completos publicados em anais de congressos:**

1. Rossato, M.; Sartório, A.; Castro, Í. B.; Pinho, G.L.L. . Indução de imposex em *Stramonita haemastoma* exposta em laboratório ao biocida anti-incrustante TBT. In: IV

Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2010, Rio Grande. Livro de Resumos do IV Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2010. p. 03018-03921.

**Resumos expandidos publicados em anais de congressos:**

1. Castro, Í. B.; Fillmann, G. Avaliação da contaminação por Organoestânicos em regiões portuárias do Sul do Brasil: utilização do imposex em *S. haemastoma*. In: V Seminário da Pós-Graduação em Oceanografia, 2008, Rio Grande. Resumos do V Seminário da Pós-Graduação em Oceanografia. Rio Grande : FURG, 2008.

2. Queiroz, L. R.; Castro, Í. B.; Rocha-Barreira, C. A.. Compostos Orgânicos de estanho: Efeitos sobre a fauna marinha. In: Colacmar, 2007, Florianópolis. Anais do XII Colacmar, 2007.

3. Maggioni, R.; Lima, A. F. A.; Castro, Í. B.; Rocha-Barreira, C. A. Análises de sequências parciais do gene 16S Mitocondrial do Gastrópode Marinho *Stramonita haemastoma* (LINNAEUS, 1767) do Litoral Brasileiro. In: Colacmar, 2007, Florianópolis. Anais do XII Colacmar, 2007.

4. Castro, Í. B. Avaliação da Contaminação por organoestânicos utilizando o imposex em *Stramonita haemastoma*. In: IV Seminário de Pós Graduação, 2007, Rio Grande. Resumos do IV Seminário da Pós Graduação. Rio Grande : FURG, 2007. p. 79-83.

**Resumos publicados em anais de congressos:**

1. Castro, Í. B.; Osorio, M.F.A; Fillmann, G. Butyltin Compounds and Imposex Occurrence in Guayaquil Gulf, Equator. In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010, Bombinhas. Livro de Resumos do XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010.

2. Alves, E.W.; Castro, Í. B. ; Fillmann, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente Aquático. In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010, Bombinhas. Livro de Resumos do XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010.
3. Alves, E.W.; Costa, P.G.; Castro, Í. B. ; Fillmann, G. Identificação de biocidas orgânicos presentes nas principais tintas anti-incrustantes de terceira geração utilizadas no pólo naval de Rio Grande/RS. In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010, Bombinhas. Livro de Resumos do XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010.
4. Castro, Í. B.; Osorio, M.F.A ; Fillmann, G. First evidence of imposex and butyltin compounds in Equator. In: SETAC North America 31st Annual Meeting, 2010, Portland. Abstracts of SETAC North America 31st Annual Meeting, 2010.
5. Costa, P.G.; La Rocha ; Castro, Í. B.; Alves, E.W. ; del Brio ; Fillmann, G. Avaliação do efeito de matriz na determinação de compostos orgânicos de estanho em tecidos de moluscos. In: XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba. Livro de Resumos XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010. v. ab034.
6. Costa, P.G.; La Rocha ; Castro, Í. B.; del Brio ; Fillmann, G. Avaliação do efeito de matriz na determinação de compostos orgânicos de estanho em sedimentos marinhos e estuarinos. In: XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba. Livro de Resumos XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010. v. ab035.
7. Castro, Í. B.; Perina, F. C.; Fillmann, G. Imposex and organotin in South America: you will find it wherever you go. In: SETAC North America 31st Annual Meeting, 2010, Portland. Abstracts of SETAC North America 31st Annual Meeting. Portland, 2010.

8. Castro, Í. B.; Nakamura, S ; Kajiwara, N ; Takahashi, S ; Tanabe, S ; Rosas, F.C.W.; Fillmann, G. Organotin compounds and total tin in coastal cetaceans from Southern Brazil. In: SETAC LA, 2009, Lima. *The Biologist (Lima)*. Lima, 2009. v. 7. p. 16-16.
9. Castro, Í. B.; Perina, F. C.; Fillmann, G.. Environmental contamination by organotins in South America: a review. In: SETAC LA, 2009, Lima. *The Biologist (Lima)*. Lima, 2009. v. 7. p. 16-16.
10. Rossato, M.; Castro, Í. B.; Sartório, A.; Fillmann, G. ; Pinho, G.L.L. Indução do Imposex em laboratório: TBT como desruptor endócrino no molusco *Stramonita haemastoma*. In: SETAC LA, 2009, Lima. *The Biologist (Lima)*. Lima, 2009. v. 7. p. 16-16.
11. Fernandez, M. A.; Castro, Í. B. Abstracts from Fourteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14) - Biomarkers of pollutants at the molecular, cellular, histological and organismic level. In: 14 International Symposium - Pollutant Responses in Marine Organisms, 2008, Florianópolis. Abstracts from Fourteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14) - Biomarkers of pollutants at the molecular, cellular, histological and organismic level. v. 66. p. 166-180.
12. Perina F. C.; Castro, Í. B.; Domingues, L. A.; Fillmann, G. Utilização de Espécies nativas na avaliação da toxicidade de compostos anti-incrustantes. In: X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2008, Bento Gonçalves. Resumos do X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2008.
13. Perina, F. C.; Marques, B. F.; Cordeiro, L. F.; Domingues, L. A.; Castro, Í. B.; Fillmann, G. Toxicidade do Diuron ao tanaidáceo estuarino *Kalliapseudes schubartii* -



avaliação ecotoxicológica com um substituto dos organoestânicos em tintas antiincrustantes. In: III Workshop de Ecotoxicologia, 2008, Rio Claro. *Holos Environment*. Rio Claro : Cea/UNESP, 2008. v. 8.

14. Demolinder, A ; Castro, Í. B.; Caldas, S.; Fillmann, G. ; Primel, E.P. Validation of the method using SPE and LC-ESI-MS/MS for determination of Triorganotin species in sea water. In: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas relacionadas, 2008, Florianópolis. Resumos do XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas relacionadas. Florianópolis, 2008.

15. Marques, B. F.; Perina, F. C.; Cordeiro, L. F.; Castro, Í. B.; Pinho, G.L.L.; Fillmann, G. Avaliação da Toxicidade do Organoestânico TBT sobre o Copépode *Acartia tonsa*. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da UCPel, 2008, Pelotas. Resumos do XXVII Congresso de Iniciação Científica da UCPel, 2008.

#### **Orientação de Mestrado:**

1. Castro, Í. B.; Orientador de Maria Fernanda Arroyo Osorio. Imposex en *Thais brevidentata*, *Thais kiosquiformis*, *Thais biserialis* (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) del perfil Centro-Sur de la costa Ecuatoriana, una indicación de contaminación por organoestañosos. 2010. Dissertação (Mestrado em Manejo Sustentable de Biorrecursos y Medio Ambient) - Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil.

#### **Participação em Bancas de Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação**

1. Fillmann, G.; Pinho, G.L.L.; Castro, Í. B.. Participação em banca de Gabriela Angonese Kolb. Avaliação Integrada da Qualidade dos Sedimentos da Região Portuária de Rio Grande: Uma Nova Abordagem. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanologia) - Universidade Federal do Rio Grande.

2. Bemvenuti, C. E; Castro, Í. B.; Krug, L.C. Participação em banca de Nathalia Sampaio Ferreira de Castro. Relatório de estágio curricular realizado no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanologia) - Universidade Federal do Rio Grande.

3. Fillmann, G.; Pinho, G.L.L.; Castro, Í. B.; Domingues, L. A. Participação em banca de Lucas Freitas Cordeiro. Avaliação da Toxicidade aguda de Irgarol 1051 e Diuron sobre o Copépodo Calanóide *Acartia tonsa*. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas.

4. Fillmann, G.; Pinho, G.L.L.; Castro, Í. B.; Perina, F. C. Participação em banca de Bianca Fell Marques. Avaliação da Toxicidade aguda de Organoestânicos sobre *Mysidopsis juniae*. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas.

**Atuação como revisor de Periódicos:**

2011 – Journal of Hazardous Materials

2010 - Periódico: Journal of Coastal Research

2009 - Periódico: Journal of Oceanography and Marine Science

2009 - Periódico: Ciencia y Tecnología del Mar

2007 - Periódico: Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology