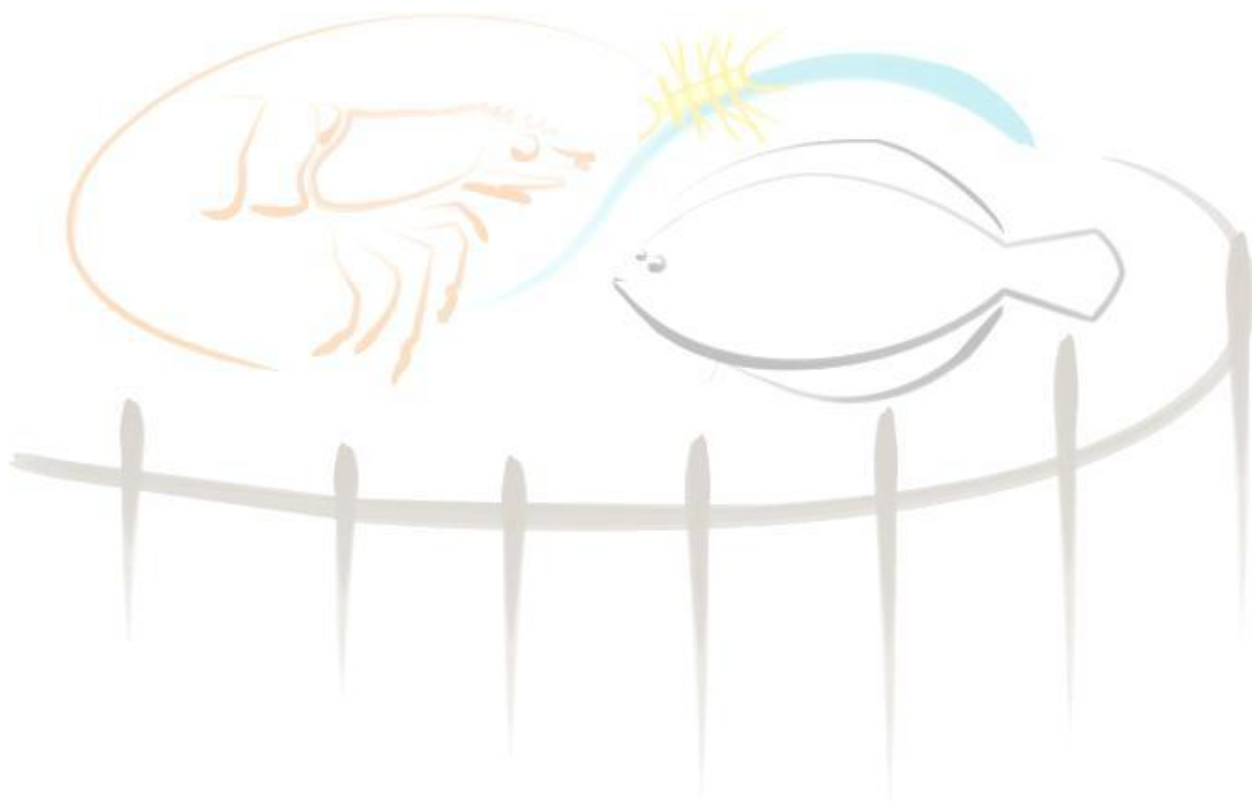


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**O uso da halófita *Sarcocornia ambigua* (Michx.) M.A.Alonso & M.B.Crespo para
fitorremediação de Tributilestanho (TBT) em sedimentos costeiros**

Ananda Duarte Arrieta

Rio Grande
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE-FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**O uso da halófita *Sarcocornia ambigua* (Michx.) M.A.Alonso & M.B.Crespo para
fitorremediação de Tributilestanho (TBT) em sedimentos costeiros**

Ananda Duarte Arrieta

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
mestre em Aquicultura no Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande -
FURG.

Orientador: Dr. César S. B. Costa

Co-orientador: Dr. Gilberto Fillmann

Rio Grande

2018

Ficha catalográfica

C331u

Arrieta, Ananda Duarte.

O uso da halófita *Sarcocornia ambigua* (Michx.) M.A.Alonso & M.B.Crespo para fitorremediação de Tributilestanho (TBT) em sedimentos costeiros / Ananda Duarte Arrieta. – 2017.
58 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,

Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2017.

Orientador: Dr. César Serra Bonifácio Costa.

Coorientador: Dr. Gilberto Fillmann.

1. Fitorremediação 2. Halófitas 3. Organoestânicos 4. tributilestanho (TBT) I. Costa, César Serra Bonifácio II. Fillmann, Gilberto
II. Título

CDU 639.3

Catálogo na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, pela paciência e calma que sempre conseguiu me transmitir. Por ter aceito esta empreitada, principalmente frente às condições adversas que nos sobrevieram, e por me ensinar tudo o que me ensinou neste convívio juntos. Obrigada por ter cumprido o real papel de orientador e mentor neste período, por sempre ter colocado a mão na massa, desde o início, e por me ajudar com as mais bobas dúvidas.

Ao meu co-orientador, por sempre estar disposto a me ajudar quando precisei de orientação.

Agradeço à minha família, por todo o apoio, e por terem sido a base firme que me sustentou até aqui. Palavras não conseguem expressar o quanto sou grata a todos vocês. Estendo estes agradecimentos à minha segunda família.

Agradeço ao meu marido, que me ajudou a resolver todos os problemas que eu não teria se não fosse por causa dele. Brincadeiras à parte, dedico este trabalho a ele. Sem ele, esta caminhada teria sido muito mais difícil.

Agradeço a todos os meus amigos que me acompanharam em mais esta etapa.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia de Halófitas e aos colegas da Ecologia Vegetal Costeira. A todos os colegas do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática, por todos os ensinamentos, palavras e parceria. Agradecimento especial ao Rodrigo, por ter sido meu braço direito (ou eu, dele?) durante todo o período de análises e escrita.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da FURG pela oportunidade, e aos órgãos financiadores pelo apoio.

Por fim, agradeço ao Ser lá de cima (quem quer que seja), por ter guiado tudo da melhor forma possível.

Índice

Lista de Tabelas.....	I
Lista de Figuras.....	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
1. Introdução.....	1
1.1. TBT: Histórico e problemática ambiental.....	2
1.2. Tributilestanho e seus metabólitos.....	4
1.3. Fitorremediação.....	5
1.4. Plantas halófitas e sua capacidade fitorremediadora.....	7
1.5. O uso potencial de espécies halófitas dos gêneros <i>Salicornia/Sarcocornia</i> para fitorremediação de TBT.....	8
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Preparo das mudas.....	11
3.2. Fortificação do sedimento com TBT.....	12

3.2.1. Homogeneização e quantificação de organoestânicos no tempo inicial.....	13
3.3. Montagem dos tratamentos experimentais.....	14
3.4. Coleta de indivíduos de <i>S. ambigua</i> e sedimento.....	16
3.5. Avaliação do desempenho fitotécnico de <i>S. ambigua</i>	17
3.6. Análises químicas.....	19
3.7. Análise dos dados.....	22
3.7.1. Efeitos do TBT no crescimento de <i>S. ambigua</i>	22
3.7.2. Efeito remediador da presença de <i>S. ambigua</i> nos sedimentos contaminados.....	23
4. Resultados.....	25
4.1. Homogeneização e concentrações iniciais de Organoestânicos.....	25
4.2. Desempenho fitotécnico de <i>Sarcocornia ambigua</i> frente a presença de TBT.....	26
4.3. Ação remediadora de <i>Sarcocornia ambigua</i> em sedimentos contaminados com butilestânicos.....	31
5. Discussão.....	39
5.1. Homogeneização e concentrações iniciais de organoestânicos.....	39
5.2. Toxicidade de organoestânico no desenvolvimento de <i>Sarcocornia ambigua</i>	40

5.3. Ação remediadora de <i>Sarcocornia ambigua</i> em sedimentos contaminados com organoestânicos.....	42
6. Conclusão.....	46
7. Referências bibliográficas.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros instrumentais.....	21
Tabela 2. Compostos, tempo de retenção, íons de monitoramento (íons de quantificação (Q) e íons de confirmação (C1 e C2)).....	22
Tabela 3. Valores das análises de homogeneização do sedimento inicial.....	25
Tabela 4. Resultado das ANOVAs bifatoriais de Medidas Repetidas para altura do caule, número de ramificações e comprimento da maior ramificação das plantas de <i>Sarcocornia ambigua</i> cultivadas em diferentes concentrações de TBT ao longo de 78 dias de experimento (n=5).....	27
Tabela 5. Média ($\pm$ erro padrão; n = 10) aos 53 dias de experimento das variáveis biométricas altura (Alt; cm), número de ramificações (Ram) e comprimento da maior ramificação (Comp; cm) das plantas de <i>Sarcocornia ambigua</i> em diferentes níveis de contaminação com TBT (controle = tratamento sem presença de TBT, nível baixo e nível alto de TBT).....	29
Tabela 6. Médias ($\pm$ erro padrões) das taxas de crescimento absoluto do número de ramificações (Ram; ramos/30 dias) e do alongamento vertical (CrescV; cm/30 dias) de plantas de <i>S. ambigua</i> coletadas no dia 78 entre 0-53 dias (A) e 53-78 dias (B) de cultivo (n = 15), bem como de todas as plantas presentes no dia 53 (C) (n = 30); onde controle = tratamento sem presença de contaminante, nível baixo = tratamento com 36,5 ngSn.g ⁻¹ e nível alto = tratamento com 365 ngSn.g ⁻¹).....	30
Tabela 7. Resultado da ANOVA bifatorial para as variáveis biomassa aérea (mg) e biomassa subterrânea das plantas de <i>Sarcocornia ambigua</i> cultivadas em diferentes concentrações de TBT aos 53 e 78 dias de experimento.....	31
Tabela 8. Médias ($\pm$ erro padrões) das taxas de crescimento relativo da biomassa aérea fresca (mg/g/dia) de <i>Sarcocornia ambigua</i> entre 0-53 dias e 53-78 dias de cultivo (n=15), onde controle = tratamento sem TBT, nível baixo e nível alto de TBT.....	31
Tabela 9. Médias ($\pm$ erro padrão) das concentrações de organoestânicos em sedimento fortificado com duas concentrações de TBT, com e sem a presença de <i>Sarcocornia ambigua</i> , coletados aos 0, 53 e 78 dias do experimento. TBT = Tributilestanho (ngSn.g ⁻¹); DBT = dibutilestanho (ngSn.g ⁻¹); MBT = monobutilestanho (ngSn.g ⁻¹) e OTs = organoestânicos totais (ngSn.g ⁻¹). Letras maiúsculas diferentes ao longo das linhas indicam diferença estatística significativa (p < 0,05) entre os tempos de cultivo, segundo o teste LSD. Para cada nível de fortificação, letras minúsculas diferentes entre concentrações de cada organoestânico indicam diferença estatística significativa (p < 0,05) entre os vasos vegetados e não vegetados de <i>S. ambigua</i> nos tempos amostrais 53 e 78 dias, segundo o teste LSD (as cores de fundo na tabela visam apenas auxiliar na visualização das médias estatisticamente comparadas).....	32

Tabela 10. Resultados das análises de variância das concentrações de TBT, DBT e MBT em sedimento no tratamento de nível baixo ($36,5 \text{ ngSn.g}^{-1}$), com e sem presença de *S. ambigua*, coletados aos 53 e 78 dias de cultivo..... 37

Tabela 11. Resultados das análises de variância das concentrações de TBT, DBT e MBT em sedimento no tratamento de nível alto (365 ngSn.g^{-1}), com e sem presença de *S. ambigua*, coletados aos 53 e 78 dias de cultivo..... 37

Lista de Figuras

Figura 1. Propagação vegetativa de <i>Sarcocornia ambigua</i> em semeadeiras de isopor dispostas em bandejas plásticas.....	11
Figura 2. a) mesa de rolamento para fortificação de sedimento com TBT; b) Plantas de <i>S. ambigua</i> cultivadas em estufa não-climatizada; c) detalhe de <i>S. ambigua</i> florescendo aos 78 dias.....	16
Figura 3. Parâmetros biométricos avaliados em indivíduos de <i>S. ambigua</i> expostos a três concentrações diferentes de TBT durante 78 dias, onde A = altura da haste principal; B = comprimento da maior ramificação secundária; C = número de ramificações.....	18
Figura 4. Formas de acondicionamento no freezer das amostras de sedimento fortificadas com TBT.....	20
Figura 5. Percentual de organoestânicos (TBT = Tributilestanho; DBT = dibutilestanho; MBT = monobutilestanho) em sedimento vegetado (V) e não vegetado (NV) com <i>Sarcocornia ambigua</i> , contaminado com duas concentrações diferentes de Sn-TBT (nível baixo = 36,5 ngSn.g ⁻¹ ; nível alto = 365 ngSn.g ⁻¹) ao longo de 78 dias de experimento (T0 = início experimento; T1 = 53 dias; T2 = 78 dias).....	26
Figura 6. Médias ($\pm$ erros padrões; n = 5) das alturas do caule principal (a), número de ramificações (b) e comprimento da maior ramificação (c) de <i>Sarcocornia ambigua</i> ao longo dos tempos amostrais 0, 53 dias e 78 dias, em 3 diferentes tratamentos (controle = tratamento sem presença de TBT, nível baixo e nível alto de TBT. Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos dias de cultivo conforme o teste LSD.....	28
Figura 7. Médias ($\pm$ erro padrão; n = 5) das biomassas frescas aéreas e subterrâneas das plantas de <i>Sarcocornia ambigua</i> ao longo dos tempos amostrais 0, 53 dias e 78 dias, nos 3 diferentes tratamentos (controle = tratamento sem presença de contaminante, nível baixo e nível alto de TBT ngSn.g ⁻¹).....	30
Figura 8. Visualização da ausência de interação significativa na concentração de TBT no sedimento (ngSn.g ⁻¹) entre o tempo amostral (53 e 78 dias) e tratamento presença de indivíduos de <i>S. ambigua</i> cultivados em contaminação de nível alto de TBT.....	34
Figura 9. Visualização da interação significativa na concentração de DBT no sedimento (ngSn.g ⁻¹) entre tempo amostral (53 e 78 dias) e tratamento presença de indivíduos de <i>S. ambigua</i> cultivados em contaminação de nível alto de TBT.....	35

Figura 10. Visualização da interação significativa na concentração de MBT no sedimento (ngSn.g^{-1}) entre tempo amostral (53 e 78 dias) e tratamento presença de indivíduos de *S. ambigua* cultivados em contaminação de nível alto de TBT..... 35

Figura 11. BDI (*ButiltnDegradation Index*) de sedimentos com dois níveis de contaminação (*baixo*: $36,5 \text{ ngSn.g}^{-1}$; *alto*: 365 ngSn.g^{-1}), cultivados com e sem presença de *S. ambigua*..... 36

Resumo

O Tributilestanho (TBT) é um composto organoestânico que, durante muitos anos, foi utilizado como principal ingrediente ativo com função biocida na formulação de tintas anti-incrustantes. Diversos estudos associaram seu uso a desequilíbrios metabólicos em distintos grupos de animais. Apesar de este composto ter sido banido, a nível mundial, da formulação de tintas anti-incrustantes pela Organização Marítima Internacional em 2008, concentrações significativas de TBT e seus produtos de degradação, dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT), ainda podem ser encontradas em regiões portuárias e ambientes estuarinos costeiros, inclusive no Brasil. A toxicidade deste composto é pouco descrita para o reino vegetal, principalmente quando se trata de plantas costeiras. Algumas plantas crescem em áreas contaminadas e talvez possam ser utilizadas para aumentar o processo de remediação dos compostos organoestânicos em sedimentos costeiros. *Sarcocornia ambigua* (Michx.) M.A.Alonso & M.B.Crespo (Amaranthaceae) é uma halófita com ampla distribuição em marismas e manguezais da costa brasileira, e também possível agente de fitorremediação do TBT. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *S. ambigua* de tolerar e descontaminar sedimentos com diferentes concentrações de TBT. Mudanças de *S. ambigua* foram cultivadas durante 78 dias em vasos com sedimentos sem contaminação (controle; n = 15) e contaminados com duas concentrações de TBT (nível baixo: $67,4 \pm 7,5$ ngSn.g⁻¹; nível alto $499,8 \pm 52,1$ ngSn.g⁻¹; média $\pm$ erro padrão; n = 15 vasos por nível de tratamento). Um grupo adicional de vasos com sedimento, mas sem plantas, foi submetido aos mesmos níveis de contaminação de TBT e também monitorado. O desempenho fitotécnico foi acompanhado através de análises biométricas de altura do caule principal, número de ramificações e comprimento da maior ramificação em três tempos amostrais (0, 53 e 78 dias). Sedimentos contaminados e controle dos vasos com plantas e sem plantas foram coletados no mesmo período amostral, sendo os organoestânicos presentes identificados e quantificados. Todas as plantas expostas aos dois níveis de TBT sobreviveram e cresceram vigorosamente, não ocorrendo diferenças significativas dos parâmetros fitotécnicos em relação às plantas controle. Independente da presença ou ausência de *S. ambigua*, a degradação de TBT em seus metabólitos (DBT e MBT) foi observada logo após a fortificação dos sedimentos, no início do experimento (6-20%

do total de organoestânicos; OTs), e aumentou marcadamente ao longo dos primeiros 53 dias (até 42% dos OTs), tanto no nível alto quanto no nível baixo de contaminação. No nível alto de contaminação, a presença de *S. ambigua* aumentou significativamente a degradação de organoestânicos nos últimos 25 dias do experimento. Ao final dos 78 dias de cultivo, o valor médio de TBT nos sedimentos vegetados (142 ngSn.g^{-1}) foi 55,6% menor e significativamente diferente do valor médio nos sedimentos não vegetados (320 ngSn.g^{-1}). Adicionalmente, nesta data, a concentração média de OTs em sedimentos vegetados reduziu a 56,2% do valor do primeiro dia do experimento, enquanto em sedimentos não vegetados esta redução foi de apenas 13,1%. Consequentemente, a presença das plantas resultou também na redução das concentrações dos metabólitos DBT e MBT, o que pode ter acontecido por alterações induzidas pela planta nas características físico-químicas e/ou microrganismos no sedimento, ou mesmo por incorporação do contaminante na matriz vegetal. A halófita *S. ambigua* demonstrou tolerância às concentrações de organoestânicos que são potencialmente capazes de acarretar efeitos adversos à biota, encontradas em sedimentos de estuários brasileiros. Esta planta foi capaz de potencializar a degradação do TBT, mostrando-se um possível agente de fitorremediação de organoestânicos.

Palavras-chave: fitorremediação; halófitas; organoestânicos; *S. ambigua*; tributilestanho (TBT).

Abstract

Tributyltin (TBT) is an organotin compound used for several years as the main biocidal active ingredient in the formulation of antifouling paints. Several studies have associated its use with metabolic imbalances in different groups of animals. Although this compound was globally banned in 2008 from the formulation of antifouling paints by the International Maritime Organization, significant concentrations of TBT and its degradation products, dibutyltin (DBT) and monobutyltin (MBT), can still be found in port regions and coastal estuarine environments, including in Brazil. The toxicity of this compound is poorly described for the plant kingdom, especially when dealing with coastal plants. Some plant species grow on contaminated areas and they may be used to enhance remediation of butyltins from coastal sediments. *Sarcocornia ambigua* (Michx.) M.A.Alonso & M.B.Crespo (Amaranthaceae) is a halophyte with wide distribution in marshes and mangroves of the Brazilian coast, and it is a potential phytoremediation agent of TBT. The aim of this work was to evaluate the ability of *S. ambigua* to tolerate and decontaminate sediments with different concentrations of TBT. *S. ambigua* seedlings were cultivated for 78 days in pots with no contamination (control) and contaminated with two concentrations of TBT (low level: $67.4 \pm 7.5 \text{ ngSn.g}^{-1}$; high level $499.8 \pm 52.1 \text{ ngSn.g}^{-1}$; mean $\pm$ standard error, $n = 15$ pots per treatment level). An additional pot group submitted to the same levels of TBT contamination but without plants was also monitored. The phytotechnical performance was monitored through biometric analyzes of shoot height, number of branches and length of the largest branch in three sampling times (0, 53 and 78 days). Contaminated and control sediments of pots with plants and without plants were collected in the same sampling period, with organotin present being identified and quantified. All plants exposed to both TBT levels survived and grew vigorously, with no significant differences in plant phytotechnical parameters in relation to control plants. Regardless of the presence or absence of *S. ambigua*, TBT degradation in its metabolites (DBT and MBT) was observed shortly after sediment fortification, at the beginning of the experiment (6-20% of total organotin; OTs), and markedly increased along the first 53 days (up to 42% of OTs), both at the high and low level of contamination. At the high level of contamination, the presence of *S. ambigua* significantly increased the organotin degradation in the last 25 days of the experiment. At the end of the 78 days of culture

the mean TBT value in vegetated sediments (142 ngSn.g^{-1}) was 55.6% lower and significantly different from the mean value in non-vegetated sediments (320 ngSn.g^{-1}). Additionally, on this date, the average concentration of OTs in vegetated sediments reduced to 56.2% of the value of the first day of the experiment, while in non-vegetated sediments this reduction was only 13.1%. Consequently, plant presence also resulted in reduced concentrations of DBT and MBT metabolites, which may have been due to plant-induced changes in physicochemical characteristics and / or microorganisms in the sediment, or even by incorporation of the contaminant into the plant matrix. *S. ambigua* halophyte has shown tolerance to organotin concentrations that are potentially capable of causing adverse effects on biota found in sediments of Brazilian estuaries. This plant was able to potentiate the degradation of TBT, showing a possible phytoremediation agent of organotin.

Keywords: Phytoremediation; halophytes; organotin; butyltin, Tributyltin (TBT).

1. Introdução

Plantas aquáticas, além de serem cultivadas para a produção de biomassa objetivando alimentação animal e humana, também apresentam potencial para um uso alternativo às aplicações tradicionais, podendo ser cultivadas para a utilização de biomassa visando a descontaminação de solos ou águas, uma vez que estes organismos apresentam a capacidade de absorver os contaminantes ou induzir alterações físico-químicas que imobilizam ou reduzem a biodisponibilidade de vários elementos e compostos (Cunningham & Ow, 1996). Este processo, denominado fitorremediação, apresenta como vantagens em relação aos métodos físico-químicos tradicionais de remoção de contaminantes o baixo impacto ambiental, baixo custo de aplicação e de manutenção (Pradhan *et al.*, 1998), aspecto paisagístico positivo, manutenção ou até mesmo melhora das propriedades físicas e biológicas do solo/água. Possibilita, ainda, aumento na estabilização do solo - o que diminui as chances de mobilização de contaminantes para áreas adjacentes (Moosavi & Seghatoleslami, 2013).

A fitorremediação é um termo relativamente novo. Esta técnica utiliza energia solar para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Wiltse *et al.*, 1998) e, frequentemente, a biomassa vegetal gerada pode ser utilizada como matéria-prima para fins como a produção de biocombustível (Gomes, 2012). Os primeiros empregos da fitorremediação consistiram na utilização de plantas para remoção de metais pesados (Otte *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1999). Entretanto, com o aumento de estudos, diversos outros compostos passaram a ser passíveis de remediação, como produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (PPCPs; *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) (Zhang *et al.*, 2013), herbicidas (Pires *et al.*, 2003; Carmo *et al.*, 2008), pesticidas (Buosi & Felfili, 2004), hidrocarbonetos (Redondo-Gómez *et al.*, 2011), contaminantes orgânicos (Schnoor *et al.*, 1995; Alkorta & Garbisu, 2001, Susarla *et al.*, 2002), além de macronutrientes de efluentes provenientes de águas de produção (Gomes-Neto & Costa, 2009) e da aquicultura (Brown *et al.*, 1999; Adler *et al.*, 2000; Ghaly *et al.*, 2005).

Um dos principais contaminantes orgânicos que tem afetado regiões costeiras em todo o mundo são os organoestânicos, principalmente a especiação química na forma de Tributilestanho (TBT). Este composto em específico foi amplamente utilizado na última metade do século XX (Omae, 2003; Okoro *et al.*,

2011; Sousa *et al.*, 2014) como principal composto ativo biocida em tintas anti-incrustantes, sendo aplicado em navios, barcos (Hoch, 2001; Almeida *et al.*, 2007) ou até mesmo em estruturas de cultivo para aquicultura (Balls, 1987). Este grupo organometálico é vastamente utilizado na indústria para os mais diversos fins, como estabilizantes de policloreto de vinila (PVC), conservantes de madeira, fungicidas, acaricidas, pesticidas e também na produção de cerveja ou desinfetantes (WHO, 1990; Omae, 2003, Sousa *et al.*, 2014). Entretanto, a rápida dispersão e consequente aumento do uso de TBT a nível mundial, aliado a impactos negativos associados à sua presença - além de um potencial efeito negativo sobre o homem - fez com que diversos estudos começassem a ser desenvolvidos, resultando em seu banimento na composição de tintas anti-incrustantes pela Organização Marítima Internacional em 2008. A contaminação de organoestânicos em áreas costeiras pode ser mitigada através da utilização de plantas nativas para fitorremediação.

1.1. TBT: Histórico e problemática ambiental

O Tributilestanho (TBT) é uma das formas de organoestânicos mais estudada, devido ao seu alto potencial poluidor, sendo capaz de causar impacto mesmo quando presente em baixas concentrações (Beaumont & Budd, 1984; Gibbs & Bryan, 1987). Este composto veio substituir compostos metálicos como o arsênio, mercúrio e chumbo em tintas anti-incrustantes à base de cobre (Yebra *et al.*, 2004; Bray, 2006). Diversos fatores fizeram com que o uso de TBT expandisse rapidamente, principalmente em regiões costeiras/portuárias e de marinas em todo o mundo (Alzieu *et al.*, 1989; Francois *et al.*, 1989; Pinochet *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2014). Dentre estes fatores, podem ser citados a alta abrangência (diversidade de espécies-alvo que inibe), alta eficiência biocida (eliminando incrustações, consequentemente diminuindo atrito entre água e casco das embarcações, resultando em redução de custos com combustível e exigência de motor) (Abbott *et al.*, 2000); maior durabilidade em relação às tintas utilizadas anteriormente; não causar corrosão galvânica; ausência de cor e apresentar miscibilidade com diversas tintas (Omae, 2003). Estimativas indicam que, entre os anos de 1965 e 1975, a produção de organoestânicos aumentou de aproximadamente 5.500 toneladas para 25.000 toneladas (Smith, 1981). Valores mais atualizados apontam uma produção

anual de aproximadamente 50.000 toneladas (Godoi *et al.*, 2003; Ayanda *et al.*, 2012), indicando uma utilização massiva destes compostos.

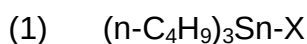
Em meados dos anos 1980, foram observados os primeiros sinais de impactos metabólicos associados à presença de TBT. Resultavam, na maioria das vezes, em disrupção endócrina – observados através do mais conhecido biomarcador de contaminação por TBT, o efeito imposex - masculinização de fêmeas de gastrópodes (Smith, 1981; Gibbs & Bryan; 1987; Axiak *et al.*, 1995; Gudmundsdóttir *et al.*, 2011) - e má formação de conchas de bivalves (Alzieu *et al.*, 1986). Entretanto, estudos demonstram que organoestânicos também apresentavam outras potencialidades como imunotoxicidade, carcinogenia ou mutagenia, inclusive em outros grupos de organismos (Sousa *et al.*, 2014). Devido ao aumento de pesquisas, o conhecimento do número de espécies que desenvolviam reações adversas a este grupo de composto também cresceu, e observou-se sua ocorrência em distintos níveis tróficos (Kannan *et al.*, 1996; Stäb *et al.*, 1996; Graceli *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014), inclusive nos níveis mais altos, em mamíferos como cetáceos, pinípedes (Tanabe, 1999) e até mesmo no ser humano (WHO, 1990; Takahashi *et al.*, 1999; Dudimah *et al.*, 2007). Diversos países passaram a proibir o uso de tintas anti-incrustantes à base de TBT e, em 2008, a Organização Marítima Internacional (IMO, 2008) emitiu um pronunciamento banindo, a nível mundial, a utilização deste composto na formulação de tintas anti-incrustantes. Este banimento foi também adotado pelo governo brasileiro através do Decreto Legislativo N° 797/2010.

Pesquisas apontam tendência de redução na incidência de casos de imposex, principalmente após o banimento do uso de TBT (Castro *et al.*, 2012b; Grimón *et al.*, 2016). Entretanto, concentrações deste composto e seus produtos de degradação continuam sendo encontradas em diversas regiões ao redor do mundo (Cao *et al.*, 2009; Grimón *et al.*, 2016), inclusive no Brasil (Artifon *et al.*, 2016). As formas metabólicas detectadas de TBT são o DBT (dibutilestanho) e o MBT (monobutilestanho), que possuem toxicidade decrescente, bem como o estanho elementar sendo a forma inorgânica da degradação sem toxicidade conhecida (Landmeyer *et al.*, 2004). Alguns locais – até mesmo áreas protegidas internacionalmente, como as Ilhas Galápagos (Grimón *et al.*, 2016) - ainda apresentam concentrações de TBT consideradas alarmantes, principalmente na América do Sul, como é o caso da costa Norte do Chile, com sedimentos

apresentando até 602 ngSn.g⁻¹ (Mattos *et al.*, 2017). No Brasil, concentrações de organoestânicos correspondendo a até 568 ngSn.g⁻¹ foram encontradas em sedimentos na região do Porto de Paranaguá (Estado do Paraná) (Santos *et al.*, 2016). No Porto do Rio Grande, através da utilização de *S. haemastoma* como biomonitor ambiental, análises de tecido apontaram concentrações de TBT atingindo valores de até 54,6 ngSn.g⁻¹ (Castro *et al.*, 2012b).

1.2. Tributilestanho e seus metabólitos

A estrutura química base dos compostos organoestânicos apresenta um átomo de estanho, normalmente ligado quimicamente a um grupo alquila ou arila e posteriormente a uma espécie aniônica, como hidróxidos ou óxidos (1) (Hoch, 2001).



Ainda segundo Hoch (2001), o número de ligações de carbono irá determinar a toxicidade do composto e sua natureza lipofílica, onde maior quantidade de ligações correspondem a maior toxicidade e lipofilicidade, diminuindo conforme há perda de carbonos (degradação de TBT para DBT, MBT e Sn), além de ser dose-dependente. Sabe-se, ainda, que a molécula de TBT possui diversas características que a possibilitam apresentar alta persistência ambiental, como elevado K_{ow} (coeficiente de particionamento octanol-água) / alta lipofilicidade / baixa solubilidade em água, expressas principalmente pela pronunciada capacidade de adsorção em partículas ou material orgânico, podendo permanecer no ambiente desde dias até várias décadas (Hoch, 2001; Antizar-Ladislao, 2008). Além disso, apresenta a alarmante possibilidade de biomagnificação de suas concentrações ao longo da cadeia trófica (Stäb *et al.*, 1996).

O tempo de meia-vida de TBT pode ser de algumas semanas a até dezenas de meses, variando com fatores físico-químicos como composição e natureza do sedimento, penetração de luz e condições anóxicas ou de aeração (Kannan *et al.*, 1996; Díez, 2002; Antizar-Ladislao, 2008, Du *et al.*, 2014). As formas de degradação de TBT podem ocorrer por fatores abióticos, como radiação UV (Brosillon *et al.*, 2016), e tendem a ocorrer mais rapidamente em temperaturas mais elevadas (Du *et al.*, 2014). Este valor tende a diminuir em solos orgânicos de florestas, por exemplo,

onde ocorre mais degradação, quando comparados a solos minerais ou terras alagadas (Huang & Matzner, 2004). Uma vez que TBT rapidamente se adsorve a partículas quando é liberado no meio ambiente, o mesmo pode ficar indisponível por diversos anos em sedimentos anóxicos (Dowson *et al.*, 1996). Entretanto, esta imobilização pode ser facilmente revertida caso ocorram processos como ressuspensão sedimentar, permitindo que o composto se torne novamente biodisponível (Unger *et al.*, 1988). Portanto, a presença de organoestânicos em sedimentos anóxicos pode se tornar desconhecidas fontes futuras de contaminação.

A ação de microrganismos tem sido associada como potencializadora de degradação de TBT em seus metabólitos, e um dos principais fatores responsáveis por este processo (Gadd, 2000; Cruz *et al.*, 2014). Uma das formas de avaliação de degradação de TBT em seus metabólitos é através da análise do *Butyltin Degradation Index* (BDI), ou Índice de Degradação de Butilestânicos (Díez, 2002), o qual avalia a quantidade de produtos de degradação presentes no sedimento (ou matriz orgânica, no caso de tecidos de gastrópodes; Castro *et al.*, 2012b) em comparação ao total de TBT. Este índice permite inferir a respeito da proximidade temporal do *input* de contaminante no meio, onde $BDI < 1$ significa *inputs* recentes de contaminantes, uma vez que as proporções entre produtos de degradação serão muito menores que a concentração total de TBT.

1.3. Fitorremediação

A utilização de plantas para recuperação da qualidade ambiental pode ocorrer através de processos de *fitoestabilização*, *rizodegradação*, *fitoextração*, *fitodegradação*, ou ainda *fitovolatilização*, e a escolha do processo de remoção ideal irá depender diretamente da natureza do composto e sua compartimentação ambiental (Barceló & Poschnerieder, 2003). A *fitoestabilização* ocorre de forma indireta, onde a presença da vegetação permite a imobilização do contaminante na região das raízes - comumente conhecida como *rizosfera* - evitando lixiviação e diminuindo sua biodisponibilidade (Susarla *et al.*, 2002). Na *rizodegradação*, a presença da planta e de seu sistema radicular é capaz de aumentar e diversificar a comunidade microbiana (e sua atividade) presente no sedimento, através de alterações físicas (e.g. grau de oxidação, umidade, etc.) e/ou da liberação de exsudatos atrativos que alteram a composição química do sedimento, resultando em um aumento nas taxas de degradação de compostos. A utilização de plantas

capazes de promover *rizodegradação* é indicada para a remoção de compostos orgânicos, derivados fenólicos e hidrocarbonetos de petróleo. Normalmente se utilizam espécies que apresentam alto desenvolvimento de sistema radicular (Reichnauer & Germida, 2008).

Os processos de *fitoextração* consistem na remoção do contaminante por ação ativa da planta, através de absorção e translocação do composto para caule e folhas. Normalmente é utilizada para remoção em sedimentos ou água com presença de metais pesados como Cd, Ni, Cu, Zn, Pb, radionuclídeos imutáveis, compostos inorgânicos, ou ainda benzenos e toluenos (Susarla *et al.*, 2002). As espécies *fitoextratoras* frequentemente apresentam crescimento rápido e alta capacidade de produção de biomassa (Barceló & Poschnerieder, 2003). As vias metabólicas de absorção e metabolização nas plantas foram detalhadamente descritas por Reichenauer & Germida (2008), apresentando três fases principais: transformação do composto, conjugação com moléculas endógenas e posterior compartimentalização. A *fitodegradação* ocorre após transcorridos os processos de *fitoextração*, quando o contaminante, já incorporado à matriz vegetal, é metabolizado em formas normalmente menos tóxicas à planta. É indicada para tratamento de solos, sedimentos, lamas, águas subterrâneas ou superficiais, sendo ideal para a remoção de compostos orgânicos como herbicidas e hidrocarbonetos que, ao invés de incorporados a componentes estruturais como paredes celulares, drusas e espículas, são liberados para o meio em secreções ou exsudatos (Susarla *et al.*, 2002). A *fitovolatilização* também ocorre após a *fitoextração*, e diz respeito à absorção do composto do sedimento, a sua combinação com uma molécula orgânica dentro da célula vegetal (frequentemente através de metilação), e consequente volatilização do composto através da região foliar (Moosavi & Seghatoleslami, 2013).

Assim, a fitorremediação surge como uma alternativa para o controle e descontaminação de solos com TBT. Como este composto tende a se acumular em regiões costeiras, a fitorremediação de TBT somente poderia ser realizada com a utilização de plantas halófitas, uma vez que são capazes de tolerar grandes concentrações de água salgada, e dominam ecossistemas costeiros como marismas e manguezais.

1.4. Plantas halófitas e sua capacidade fitorremediadora

A capacidade de halófitas em se desenvolver em marismas contaminados com metais pesados sem apresentar efeitos adversos, além da possibilidade de seu uso como biomonitoras de contaminação ambiental – por apresentarem relação direta entre a concentração do contaminante em seu tecido e o teor deste contaminante no sedimento/água - foi demonstrado por Williams *et al.* (1994). Neto & Costa (2009) demonstraram a viabilidade de desenvolvimento da halófito *Spartina alterniflora* em águas contaminadas com altos teores de hidrocarbonetos originárias do processo de produção de petróleo. Reboreda & Caçador (2007) evidenciaram a capacidade de *Halimione portulacoides* e *Spartina maritima*, duas halófitas comumente encontradas em regiões costeiras, para fitorremediação de metais pesados, principalmente através de processos de *fitoestabilização*.

Em 2005, Novak & Trapp realizaram um estudo com 38 espécies vegetais, a maioria não halófitas, demonstrando a capacidade de diversas destas espécies, entre elas cevada e sorgo, se desenvolverem em sedimentos contaminados com TBT oriundos de dragagem. Entretanto, considerando o fato que os principais usos dados aos organoestânicos estão associados principalmente a regiões costeiras, e diversos estudos terem apresentado a tendência destes compostos acumularem nestas áreas (Antizar-Ladislao, 2008; Castro *et al.*, 2012a; Batista-Andrade *et al.*, 2018), a fitorremediação *in situ* de TBT apresenta a limitação da necessidade da utilização de plantas que tolerem tais condições, favorecendo a utilização de halófitas nativas para remoção do contaminante.

A fitorremediação de TBT pela fanerógama submersa marinha *Zostera marina* (L.) foi observada por Francois *et al.* (1989), que demonstrou a capacidade desta espécie em fitodegradar este composto em metabólitos menos tóxicos, além de sugerir seu potencial uso como biomonitora ambiental de contaminação. Da mesma forma, estes autores apontaram a possibilidade de entrada deste composto na cadeia trófica, e o perigo associado à absorção de contaminantes pela espécie, uma vez que ela é considerada um dos alimentos base do ecossistema. Anderson *et al.* (2002) avaliaram a capacidade da halófito *Spartina alterniflora* em degradar TBT presente em uma área alagada criada artificialmente. Ao final do experimento, demonstraram que esta espécie apresenta eficácia em fitoestabilizar o contaminante no sedimento, uma vez que acumulou maiores concentrações de TBT em sua biomassa subterrânea. Entretanto, não obtiveram resultados positivos quanto a

fitodegradação deste composto. Em estudo similar desenvolvido por Carvalho (2017), *S. alterniflora* potencializou a degradação de TBT em seus metabólitos, e reduziu significativamente o total de organobutílicos em relação a sedimentos controle não vegetados.

1.5. O uso potencial de espécies halófitas dos gêneros *Salicornia* /*Sarcocornia* para fitorremediação de TBT

Salicornia e *Sarcocornia* são gêneros cosmopolitas de plantas halófitas da família das *Amaranthaceae*, que apresentam estruturas florais reduzidas e imersas em suas hastes suculentas e segmentadas, com distribuição geográfica mundial em zonas costeiras e solos salinizados (Alonso & Crespo, 2008). Suas plantas são importantes bioindicadoras e hiperacumuladoras de metais (Smillie, 2015), além de serem reconhecidas por sua capacidade de remediação de compostos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Martins *et al.*, 2008), metais (Idaszkin *et al.*, 2017) e efluentes oriundos de rejeitos de mineração (González-Alcaraz *et al.*, 2011) e de aquicultura (Costa *et al.*, 2003). Análise das concentrações de cobre e zinco no sedimento de um estuário do Reino Unido, comparados com as concentrações presentes no tecido vegetal de indivíduos de *Salicornia*, permitiu sua classificação como biomonitora de contaminação ambiental destes compostos específicos (Smillie, 2015). Carvalho *et al.* (2010) demonstraram que sedimentos da zona entre marés da costa de Portugal ocupados por halófitas perenes do gênero *Sarcocornia* apresentaram capacidade de redução nas concentrações de TBT quando comparados a sedimentos contaminados sem vegetação.

O gênero *Sarcocornia* encontra-se amplamente distribuído na América do Sul (Alonso & Crespo, 2008), e possui alta tolerância ao estresse salino, inclusive crescendo em áreas hipersalinas de marismas e manguezais atingidas apenas por marés sizígias (Isacch *et al.*, 2006; Freitas & Costa, 2014). No Brasil, a espécie ocorrente do gênero, com ampla distribuição geográfica, é a *Sarcocornia ambigua*, que apresenta potencial de fitorremediação de solos salinizados e de macro nutrientes dos efluentes da carcinocultura (Costa & Herrera, 2016). Além disso, é capaz de gerar diferentes produtos da sua biomassa (ex.: fonte de ácidos graxos e produção de biodiesel; Costa *et al.*, 2014). Doncato & Costa (2017) mostraram que plantas originadas de dois biótipos de *S. ambigua* possuem capacidade de hiperacumularem Fe e Mn em solos ricos nestes elementos.

A ocorrência de *S. ambigua* ao longo de toda a costa brasileira, em regiões portuárias, de marismas e de mangues - onde contaminação por TBT tem sido detectada (Castro *et al.*, 2012a; Santos *et al.*, 2016) – bem como o histórico em relação a contaminantes inorgânicos e orgânicos do gênero *Sarcocornia*, sugerem um potencial de uso dessa espécie nativa para o biomonitoramento e fitorremediação do TBT em nossa região costeira. Entretanto, estudos detalhados sobre a toxicidade deste composto sobre *S. ambigua* e a interação desta planta com solos contaminados precisam ser desenvolvidos.

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

Avaliar a capacidade da halófita *Sarcocornia ambigua* de tolerar e descontaminar sedimento com diferentes concentrações de Tributilestanho (TBT), bem como se esta espécie favorece a degradação deste composto (*i.e.*, formação de DBT e MBT) no sedimento contaminado.

2.2. *Objetivos específicos*

- Verificar a toxicidade da exposição a diferentes concentrações de TBT na halófita *S. ambigua*.
- Avaliar o potencial de remediação de sedimentos contaminados com TBT pela halófita *S. ambigua*.

3. Material e Métodos

3.1. Preparo das mudas

As mudas de *S. ambigua* foram originadas do germoplasma do Laboratório de Biotecnologia de Halófitas (BTH-IO-FURG), através de propagação vegetativa a partir de fragmentos de caule (“estacas”) de indivíduos adultos (Costa & Herrera, 2016). Inicialmente, os fragmentos foram cultivados em semeadeiras de isopor, utilizando como substrato areia de praia, sendo mantidos em condição saturada dentro de bandejas com água (Fig.1). A linhagem utilizada para o experimento foi a denominada BTH2 (Doncato & Costa, 2017), a qual apresenta altas taxas de crescimento, além da homogeneidade genética de indivíduos.

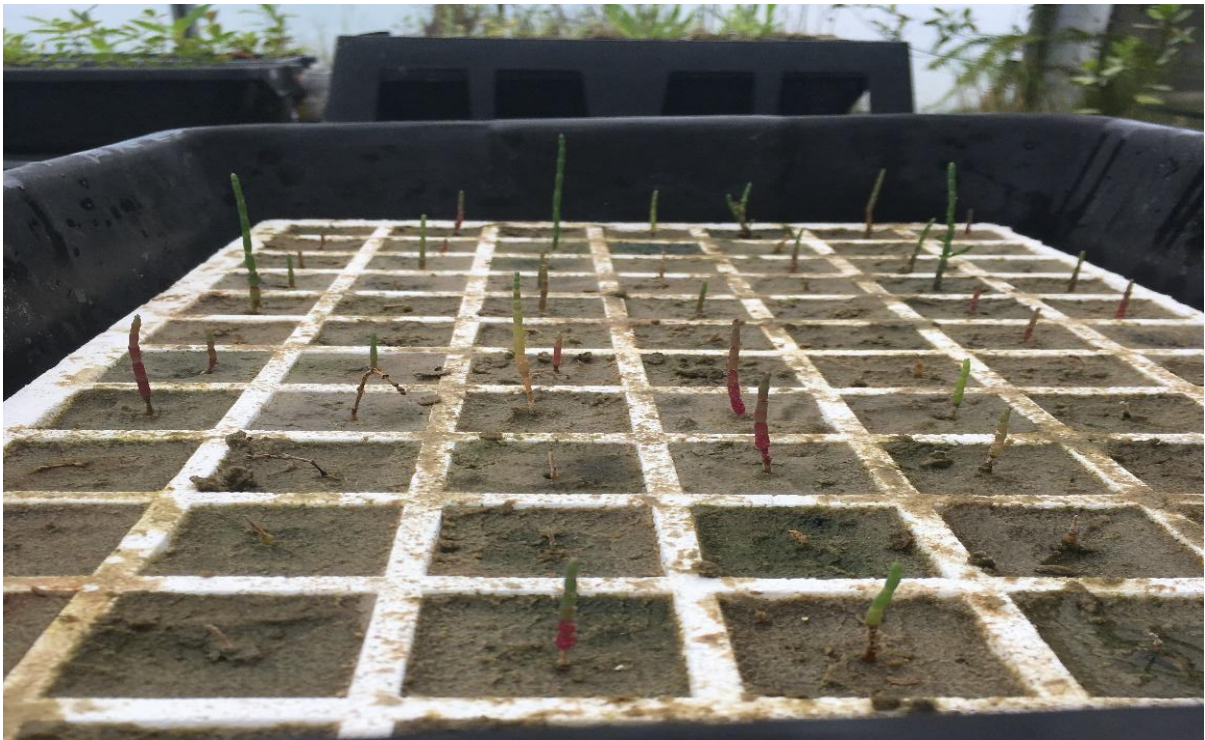


Figura 1. Propagação vegetativa de *Sarcocornia ambigua* em semeadeiras de isopor dispostas em bandejas plásticas.

A água das bandejas foi trocada a cada duas semanas, sendo adicionada, a cada troca, solução nutritiva de Hoagland (10%), a fim de fornecer os nutrientes necessários para um bom desenvolvimento das plântulas. Após atingirem tamanho considerado adequado (aproximadamente 9cm) para transferência, as mudas foram removidas das semeadeiras, e as raízes foram cuidadosamente separadas da areia e lavadas com água destilada. Os indivíduos foram plantados em vasos com capacidade aproximada de 500g de sedimento, onde se desenvolveu o experimento.

3.2. Fortificação do sedimento com TBT

A contaminação do sedimento com TBT, aqui referido como *fortificação*, tomou como base os dois níveis estipulados pela legislação brasileira na Resolução CONAMA 454/2012. Esta legislação diz respeito e regulamenta o gerenciamento do material dragado em águas de jurisdição nacional, onde a caracterização da presença de TBT é limitada apenas à descrição de suas concentrações em água salobra. São estipulados dois níveis de contaminação, a saber: Nível 1, correspondendo ao “limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota”; e Nível 2, correspondendo ao “limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota”. Assim, o sedimento do experimento apresentou, nominalmente, a concentração inicial de 100 ngTBT.g^{-1} ($36,5 \text{ ngSn.g}^{-1}$) e $1.000 \text{ ngTBT.g}^{-1}$ (365 ngSn.g^{-1}), ou nível 1 e nível 2, de acordo com a legislação brasileira vigente. Dados da literatura (Castro *et al.*, 2012b; Sant’anna *et al.*, 2014), apesar de apontarem uma tendência de redução nas concentrações de TBT encontradas nas principais regiões portuárias da região sul e sudeste brasileiras, ainda registram ocorrência de valores entre os níveis 1 e 2 citados na legislação.

O sedimento utilizado no experimento foi previamente preparado, sendo composto por 50% de areia fina de praia (coletada na Praia do Cassino, RS, Brasil) e 50% de composto orgânico, previamente peneirado em malha de 5mm. A granulometria do solo preparado foi estimada através de peneiramento, sendo este composto por 3,8% de areia grossa, 3,6% de areia média, 90,1% de areia fina, 2,5% de fração silte/argila e um teor de matéria orgânica de aproximadamente 1,46%. A fortificação do sedimento seguiu o protocolo de contaminação da EPA (USEPA, 2001), através do método de rolagem de frascos. Para o processo de fortificação, foi preparada uma solução estoque de 0,005g de TBT diluído em acetona, sendo conservada em geladeira para posterior utilização. A análise de qualificação da solução foi feita logo após seu uso, sendo verificada a presença unicamente de TBT.

Foram preparados aproximadamente 10kg de sedimento para cada nível de contaminação aplicado no tratamento experimental. Deste total, 25% do sedimento foi seco em estufa, sendo calculado, por gravimetria, a perda de umidade durante este processo. A partir de uma determinada quantidade de solução estoque, calculada para alcançar os valores nominais dos níveis de contaminação propostos, esta porcentagem inicial de sedimento foi fortificada e disposta em uma mesa de rolagem (Fig. 2a), programada para 42 rpm, durante 1 hora, a fim de homogeneizar

a solução fortificante com o sedimento a ser contaminado. Decorrido este tempo, o restante do sedimento (75%) foi misturado à porcentagem inicialmente fortificada, e a quantidade de umidade perdida foi repostada com água destilada. O sedimento voltou à mesa de rolagem, ficando neste processo por mais 6 horas. A estocagem do sedimento fortificado até a montagem dos vasos de cultivo foi feita em frascos de vidro, comportando 2kg de sedimento preparado cada, devidamente vedados e externamente recobertos com fita adesiva preta, a fim de evitar ao máximo penetração de luz e, conseqüentemente, fotodegradação do TBT presente. O sedimento não fortificado utilizado em vasos controle de crescimento das plantas passou por todos os mesmos processos de rolagem. Antes e após os processos de fortificação, os frascos utilizados foram submetidos a processos de descontaminação, passando por banho de Extran (10%), seguido de banho de ácido nítrico (10%), permanecendo ao menos 24 horas em cada processo. Após, foram secos em estufa a aproximadamente 35°C, sendo rinsados (3x acetona; 3x hexano). Após a realização do protocolo, os vidros contendo o sedimento fortificado foram conservados em freezer, em posição horizontal, até o início do experimento (por 15 dias). A fim de evitar ao máximo a perda de organoestênicos por processos naturais de degradação entre o período de fortificação e início do experimento, estipulou-se a seguinte ordem de fortificação/rolagem: sedimento não contaminado, sedimento com maior grau de contaminação, finalizando com o sedimento com menor grau de contaminação, devidamente descritos a seguir.

3.2.1. Homogeneização e quantificação de organoestênicos no tempo inicial

Para fins de comparação, todos os valores de butilestênicos expostos ao longo do trabalho estarão na forma de ngSn.g^{-1} . No início do experimento, coletou-se sedimento para duas análises: primeira, para qualificação e quantificação dos butilestênicos presentes no sedimento inicial (concentração inicial real); e segunda, para verificação da eficiência dos processos de homogeneização do sedimento fortificado. Ambas as amostras foram acondicionadas da mesma forma (sob refrigeração, e em embalagens de papel alumínio previamente calcinadas). Para avaliar a eficiência dos processos de homogeneização da metodologia empregada, escolheu-se aleatoriamente um frasco de cada nível de contaminação, sendo coletada uma amostra de sedimento de cada nível (superfície, meio e fundo). Para estimar a quantidade de butilestênicos no início do experimento, para cada nível de

contaminação e para o sedimento controle não contaminado, foi coletada uma amostra aleatória de sedimento em três frascos de estocagem.

3.3. Montagem dos tratamentos experimentais

O bioensaio foi conduzido segundo as recomendações de caracterização do solo da Resolução CONAMA 420 de 2009 e do procedimento de avaliação de fitotoxicidade da ISO 11.269-2 (ISO 2002). Plantas de *S. ambigua* foram cultivadas em estufa não climatizada no período de dezembro de 2016 a fevereiro de 2017, totalizando 78 dias de experimento. A época do ano escolhida para desenvolvimento do bioensaio foi o verão na região de estudo, onde a maior incidência solar, e temperaturas mais altas, favorecem o crescimento da espécie (Costa & Bonilla, 2016). No início do experimento, os vasos a serem utilizados foram devidamente limpos, sendo revestidos internamente com papel alumínio, previamente calcinado em forno mufla a 450°C por 6 horas. Além do revestimento interno, foi separada uma porção extra de papel alumínio, a fim de revestir a parte superior do sedimento, exteriorizando apenas a planta (Fig. 2b). Este procedimento visou diminuir ao máximo a penetração de luz no sedimento, uma vez que o composto TBT tende a sofrer processos de fotodegradação, e a luz poderia vir a estimular o crescimento de algas e briófitas na superfície do sedimento que, interagindo com os organobutílicos, dificultariam a detecção do efeito da presença das plantas sobre estes compostos. Todos os procedimentos durante a confecção do experimento tiveram a devida atenção, visando evitar ao máximo contaminação cruzada, tanto de objetos externos com o experimento (como, por exemplo, o contato de objetos plastificados, que poderiam conter organoestênicos em sua composição), quanto o contato do próprio contaminante com o meio externo ao experimento.

Em cada vaso, foi adicionado – com o auxílio de uma espátula de aço inox previamente descontaminada - 450g de sedimento fortificado e controle (sem contaminação). No início do experimento, quinze plantas foram aleatoriamente selecionadas e coletadas para estimativa da biomassa inicial individual. Foram confeccionados 10 vasos *vegetados* e 10 *não vegetados*, para cada nível de contaminação, a saber: *controle* (sem contaminação); nível baixo e nível alto. Foram recolhidos 5 vasos *vegetados* e 5 vasos *não vegetados* para cada nível de contaminação.

Em cada vaso *vegetado*, foi transplantada uma muda de *S. ambigua*, inicialmente constituída por um caule principal, ramificações e raízes. Os vasos foram dispostos dentro de Placas de Petri, previamente limpas e descontaminadas que, no decorrer do experimento, serviram de local de deposição da água para irrigação do sedimento. Uma vez que, nos primeiros dias do experimento, as raízes das plantas ainda não se encontravam desenvolvidas a ponto de conseguirem absorver água das Placas de Petri dispostas abaixo dos vasos, as primeiras regas foram realizadas com o auxílio de um borrifador, ocorrendo de cima para baixo no vaso. A primeira rega ocorreu até o ponto de saturação do vaso. Aproximadamente 10 dias após o início do experimento, as regas passaram a ser da parte inferior para a parte superior do vaso, sendo adicionado 50 ml de água destilada às Placas de Petri a cada, aproximadamente, 2 dias (ou em uma frequência maior, conforme a aparência do sedimento e a temperatura da estufa). As regas utilizando placas de Petri visavam evitar a lixiviação de nutrientes e, conseqüentemente, do contaminante, para fora do vaso. Concomitante às regas, tomou-se nota dos dados de temperatura da estufa. Semanalmente, todos os vasos passavam por um rodízio, tendo suas posições nas bancadas trocadas de forma aleatória, a fim de permitir que todos ficassem expostos a todas as condições fornecidas pelas diferentes posições dentro da estufa.

No dia 22, os vasos foram irrigados com solução de Hoagland plena (com 5% de NaCl), a fim de fornecer nutrientes e sal necessários ao bom desenvolvimento das plantas. Foi borrifada, uma vez, solução salina (5%), a fim de evitar crescimento de epífitas/musgo nas plantas ou no sedimento. Foi borrifada, uma vez, solução de Malathion (1%), a fim de evitar herbivoria (somente foi adicionada esta solução por ter sido encontrada uma lagarta entre as plantas cultivadas). Apenas as plantas do último lote de coletas foram borrifadas (78 dias). A definição de encerramento do experimento se deu quando se observou processos iniciais de polinização (Fig. 2c), uma vez que a planta tende a realocar energia e nutrientes que estariam disponíveis para crescimento, para reprodução.

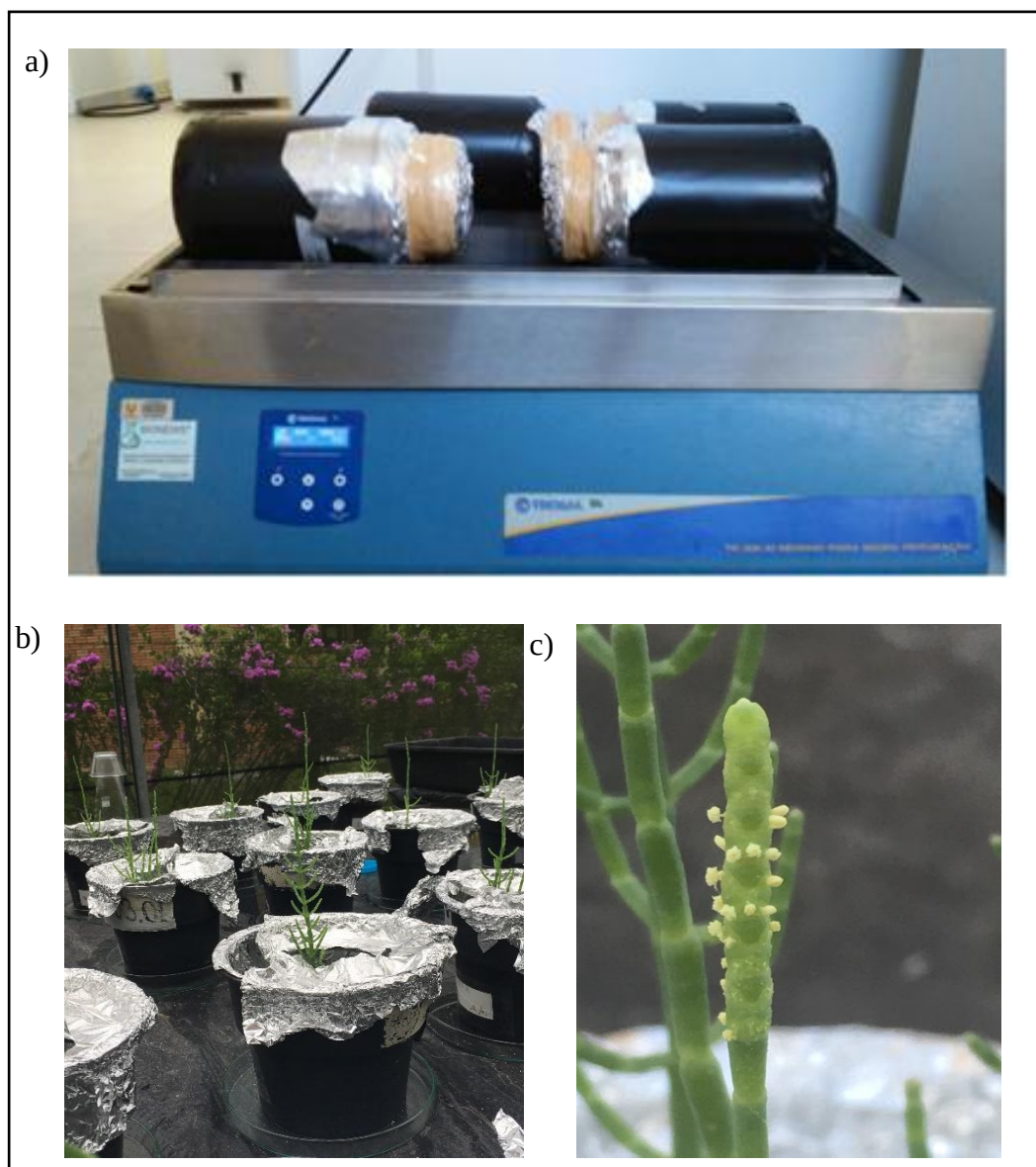


Figura 2. a) mesa de rolagem para fortificação de sedimento com TBT (Fonte: Carvalho, 2017); b) Plantas de *S. ambigua* cultivadas em estufa não-climatizada; c) detalhe de *S. ambigua* florescendo aos 78 dias.

3.4. Coleta de indivíduos de *S. ambigua* e sedimento

No início do experimento, foi realizada a biometria de todos os indivíduos, além da coleta de sedimento dos três tratamentos determinados. Aos dias 53 e 78, foram escolhidos aleatoriamente 5 vasos de cada um dos tratamentos. O sedimento foi coletado com espátula de aço inox e armazenado em embalagens de alumínio previamente calcinadas em forno mufla (450°C por 6 horas), sendo congelado para posterior análise. As plantas foram retiradas cuidadosamente do vaso, sendo separadas em parte aérea (caule/haste principal e ramificações) e raízes. As raízes

foram lavadas com água destilada, a fim de retirar o sedimento adsorvido nas mesmas, e armazenadas em papel alumínio previamente muflado. O mesmo procedimento de coleta e armazenamento foi realizado para a porção aérea dos indivíduos. As raízes e caule coletados foram mantidos sob refrigeração em caixas de isopor com gelo, pesados no mesmo dia da coleta e posteriormente conservados em freezers do laboratório, onde foram mantidas congeladas até o momento das análises químicas.

Assim, o desenho experimental para avaliação do efeito do TBT no desenvolvimento de *S. ambigua* caracterizou-se como fatorial, havendo 3 tempos amostrais de avaliação do desenvolvimento e desempenho dos indivíduos (0 dias, 53 dias e 78 dias) e 3 concentrações distintas do contaminante (0, nível baixo e nível alto). A avaliação da taxa de degradação dos butilestânicos no sedimento foi feita separadamente para cada nível de TBT nos sedimentos contaminados e um desenho experimental fatorial duplo com um tratamento controle inicial adicional. O fator *data* de avaliação dos contaminantes tinha 2 níveis (53 e 78 dias), a presença das plantas de *S. ambigua* tinha 2 níveis (vegetado e não vegetado) e o tratamento controle inicial adicional foi constituído pelas amostras do sedimento fortificado no dia “zero”.

Todo o material utilizado na montagem do experimento foi devidamente descontaminado após o uso. Todo o resíduo gerado da montagem do experimento foi devidamente armazenado, sendo recolhido, posteriormente, pela empresa responsável por remoção de resíduos dos laboratórios da FURG.

3.5. Avaliação do desempenho fitotécnico de *S. ambigua*

Nos 3 tempos amostrais (0, 53 e 78), foram coletados dados biométricos - *altura do caule principal* (cm), *número de ramificações* e *comprimento da maior ramificação* (cm) - de todos os indivíduos presentes no experimento (Fig. 3).

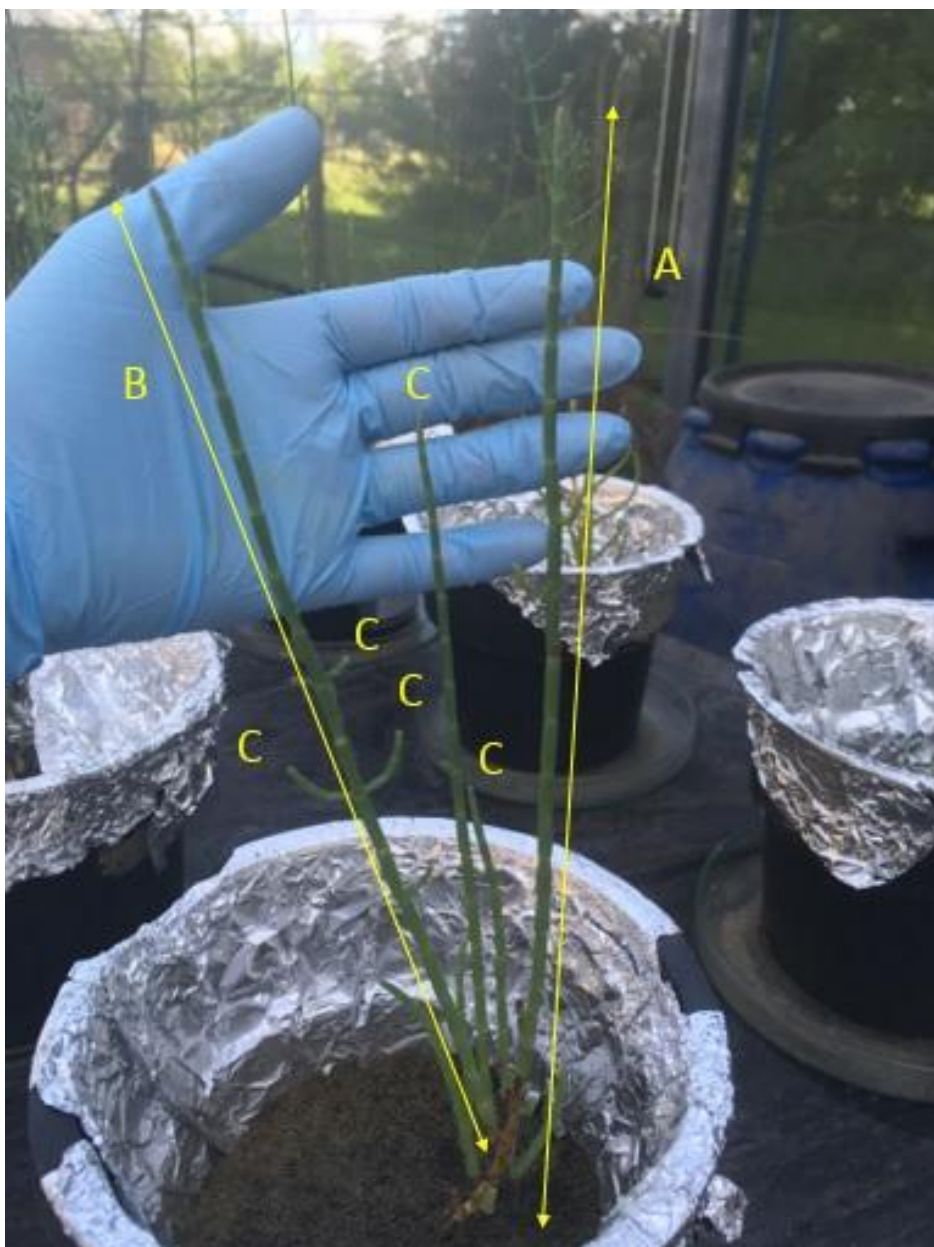


Figura 3. Parâmetros biométricos avaliados em indivíduos de *S. ambigua* expostos a três concentrações diferentes de TBT durante 78 dias, onde A = altura da haste principal; B = comprimento da maior ramificação secundária; C = número de ramificações.

Para avaliação da biomassa, os indivíduos (caule e raiz devidamente separados e identificados) foram pesados no momento de sua respectiva coleta, sendo armazenados congelados para posterior análise. Previamente às análises químicas, os mesmos foram secos em liofilizador (Liotop - L101 e Solab SL-404) por aproximadamente 3 dias e pesados em balança de precisão (mg), a fim de verificar seu peso seco.

3.6. Análises químicas

Os compostos organoestânicos (TBT, DBT e MBT) foram analisados em três réplicas, nas três datas de coleta (0, 53 e 78 dias) e em três concentrações pré-determinadas (*controle*, *nível baixo* e *nível alto*), quantificados e qualificados em sedimentos *não vegetado* e *vegetado*.

Todas as análises químicas seguiram protocolos laboratoriais, além de processos rotineiros de descontaminação e higienização de vidrarias e material. Todo o material utilizado na montagem dos experimentos foi previamente descontaminado, ficando 24 horas em banho de Extran (10%), seguido de banho de ácido nítrico (10%) por mais 24 horas, sendo secos em estufas a aproximadamente 35°C. Após os devidos processos de descontaminação (forno mufla, ou banhos de Extran + ácido), as vidrarias e materiais de aço foram lavados (rinsados; 3 vezes com acetona e 3 vezes com hexano) antes de qualquer procedimento desenvolvido.

O preparo das amostras de sedimento para as análises químicas consistiu em secagem em liofilizador (Liotop – L101) por aproximadamente 3 dias, desagregação/maceração e armazenamento em frascos de vidro, devidamente descontaminados, rinsados e etiquetados. A fim de evitar continuidade nos processos de degradação do contaminante, os frascos supracitados foram recobertos com papel alumínio e mantidos em freezer até a devida análise (Fig. 4). As análises químicas foram realizadas de forma que amostras de mesmo nível de contaminante fossem analisadas no mesmo dia, visando evitar contaminação cruzada, diminuindo as chances de contaminação de amostras com diferentes concentrações.



Figura 4. Formas de acondicionamento no freezer das amostras de sedimento fortificadas com TBT.

As análises seguiram o protocolo de extração descrito por Castro *et al.* (2015). Pesou-se 2 g de amostra de sedimento (anotando o peso exato, para posterior verificação dos analitos) em frasco âmbar de 40 ml, sendo fortificado com 100 μ l (1.000 ng.ml^{-1}) de padrão de recuperação Tripropilestanho (TPrT). O frasco foi agitado em vórtex por 1 minuto. Após 30 minutos, adicionou-se ao frasco âmbar 15 ml de Tropolona 0,05% em Metanol e 1 ml de ácido clorídrico concentrado, agitando no vórtex por, aproximadamente, 1 minuto. Após a homogeneização em vórtex, a amostra passou por 15 minutos de banho ultrassônico a 40°C, logo em seguida sendo levada a centrifuga por 10 minutos a 3250 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um funil de separação contendo 150 ml de Cloreto de Sódio (10% em água ultrapura Milli-Q). Os procedimentos de extração anteriores (da adição de Tropolona ao recolhimento do sobrenadante em balão de separação) foram repetidos 3 vezes. Após a terceira extração, o próximo procedimento realizado foi a extração líquido-líquido, que se deu adicionando 20 ml de Diclorometano ao funil de separação. Assim, a fase orgânica do extrato foi recolhida em balão (de 250 ml), passando por funil com sulfato de sódio anidro e lã de vidro. Este processo foi repetido 3 vezes. O volume recolhido no balão foi transferido para frasco de evaporação Syncore; o funil com sulfato de sódio utilizado foi lavado com Diclorometano e o balão foi lavado com aproximadamente 8 ml de hexano, sendo tudo recolhido no frasco apropriado supracitado, tendo seu conteúdo evaporado em sistema Syncore até o volume aproximado de 1 ml. O extrato foi

transferido para frasco âmbar devidamente fechado, passando por processo de purga, onde o Oxigênio foi substituído por Nitrogênio.

O processo de derivatização, que resulta nos organoestânicos em sua forma mais volátil e estável e, portanto, detectáveis por cromatografia gasosa (Godoi *et al.*, 2003), se deu através de Reação de Grignard, adicionando, com seringa de vidro, 2 ml de Brometo de Pentilmagnésio em solução de Éter Dietílico 2 mol.l⁻¹. Após 30 minutos, a amostra foi posta em banho gelado, uma vez que a reação é muito exotérmica, sendo adicionado 12 ml de água ultra-pura Mili-Q e 1 ml de ácido clorídrico, ambos resfriados. Após, outra extração líquido-líquido foi realizada, adicionando 5 ml de hexano, sendo este processo repetido 3 vezes. O sobrenadante foi retirado para frasco de evaporação Syncore, sendo evaporado neste equipamento a até, aproximadamente, 1 ml. O extrato foi transferido para uma coluna de Sílica (3,5 g; ativada a 160°C por 6 horas) finalizada com Sulfato de Sódio, juntamente com 15 ml de solução Hexano/Tolueno (1:1) para eluição. Após a purificação do extrato, o mesmo foi evaporado em gás Nitrogênio até, aproximadamente, 0,5 ml. Após a evaporação, o resultante foi transferido para *vial*, onde foi adicionado 100 µl do padrão interno (Tetrabutilestanho), sendo aferido a 1 ml com Hexano. As concentrações dos organoestânicos do extrato final das amostras foram quantificadas através de cromatógrafo de fase gasosa através de injetor Split/Splitless e um detector de espectrometria de massas tipo quadrupolo, equipado com um amostrador automático (CG-MS Perkin Elmer modelo Clarus 500 MS), de acordo com parâmetros instrumentais pré-determinados (Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros instrumentais.

Parâmetros	Valor
Injetor	<i>Split/Splitless</i> (1/50)
Temperatura	280°C
Volume de injeção	2 µL
Vazão total do gás de arraste	1,7 mL.min ⁻¹ (Hélio > 99,999%)
Detector	MS
Temperatura da fonte de ionização	200°C
Temperatura da interface	300°C
Coluna	ZB 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Para análises, a temperatura de forno foi mantida a 80°C por 2 minutos, e elevada a 300°C a 11°C.min⁻¹. Os íons de monitoramento, tempos de retenção, e respectivas massas molares utilizadas para identificação dos compostos estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos, tempos de retenção, íons de monitoramento (íons de quantificação (Q) e íons de confirmação (C1 e C2)).

Compostos	Tempo de retenção (min)	Q (m/z)	C1 (m/z)	C2 (m/z)
Tributilestanho	13,30	179	261	263/319
Dibutilestanho	14,14	249	317	319/315
Monobutilestanho	14,90	193	317	319
Tripropilestanho	10,90	273	275	277
Tetrabutilestanho	12,42	177	233	235/291

3.7. Análise dos dados

3.7.1. Efeitos de TBT no crescimento de *S. ambigua*

Os dados de *altura do caule principal, número de ramificações e comprimento da maior ramificação* das plantas de *S. ambigua* nos dois níveis de TBT ao longo do experimento foram avaliados por Análises de Variância (ANOVA) bifatoriais de medidas repetidas (Zar, 2010). O efeito da exposição ao TBT sobre as variáveis biométricas foi também avaliado através de ANOVA unifatorial entre níveis do contaminante realizadas com os dados do dia 53 (T53; n=30).

As taxas de crescimento absoluto do número de ramificações e do alongamento vertical foram estimadas para todas as plantas em todos os tratamentos (*sem* e *com* presença de contaminante), através da diferença dos valores obtidos ao final e no início do experimento, divididos pelo tempo que o indivíduo ficou exposto. Este valor foi expresso por 30 dias (x30; ramos/30 dias e cm/30 dias, respectivamente). As taxas de crescimento relativo da biomassa aérea fresca foram estimadas através da diferença entre a biomassa final e inicial fresca, dividido pela biomassa inicial, dividido pelo tempo que o indivíduo ficou exposto (mg/mg/dia). As taxas supracitadas foram avaliadas através de ANOVAs unifatoriais, entre todos os tratamentos, considerando os períodos amostrais 0-53 dias (n=30) e

53-78 dias (n=15). A avaliação do desenvolvimento de biomassa aérea e subterrânea (mg) ao longo do experimento se deu por ANOVA bifatorial (tratamento com TBT x tempo de exposição). Apenas os dados de biomassa fresca foram analisados.

Todos os testes consideraram nível de significância de 5%, e quando as ANOVAs apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste *post-hoc* LSD, a fim de caracterizar qual das médias havia apresentado tal diferença. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram verificados através dos testes Kolmogorov-Smirnov e Levene's, respectivamente. Quando realizadas ANOVAs de medidas repetidas, a esfericidade foi avaliada através dos índices GG-HF. Os dados que não apresentaram distribuição normal passaram pela transformação matemática $\text{Log}_{10}(x)$ (biomassa aérea e biomassa subterrânea), apresentando tal informação na tabela correspondente.

3.7.2. Efeito remediador da presença de *S. ambigua* nos sedimentos contaminados

Para avaliação do efeito da presença de vegetação em sedimentos contaminados (*vegetados* e *não vegetados*), foram analisadas triplicatas do nível baixo e alto de contaminação, de todos os tempos amostrais. Da mesma forma, foram analisadas triplicatas dos tratamentos controle, a fim de verificar inexistência de contaminação cruzada ao longo do bioensaio, ou ao longo dos processos de extração e análise de contaminantes. Resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. As análises químicas apresentaram as concentrações de TBT, DBT e MBT ao longo das três datas de coleta (inicial, 53 dias e 78 dias). A concentração de organoestânicos totais (OTs) também foi calculada, correspondendo ao somatório de todas as formas presentes. Todos compostos foram apresentados em ngSn.g^{-1} . Os fatores de conversão utilizados foram de 2,74; 2,56 e 2,38 para TBT, DBT e MBT, respectivamente.

Todos os testes consideraram nível de significância de 5%, e quando as ANOVAs apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste *post-hoc* LSD, a fim de caracterizar qual das médias havia apresentado tal diferença. Para avaliação do efeito de *S. ambigua* na concentração de TBT e seus metabólitos ao longo do tempo, ANOVAs de 1 via foram aplicadas às concentrações das três datas amostrais. Adicionalmente, diferenças nas concentrações dos

organoestânicos presentes nos últimos 25 dias de experimento (53 dias e 78 dias) foram avaliadas através de ANOVAs bifatoriais, considerando tempo, a presença ou ausência de *S. ambigua* e a interação entre estes dois fatores. Estas ANOVAs foram calculadas separadamente para cada nível de contaminante. Todos os organoestânicos foram avaliados quanto às condições de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene's). Para correções de normalidade, todas as formas de organoestânicos foram transformados através de raiz quadrada.

As taxas de degradação ou incorporação (devido a formação de metabólitos) dos organoestânicos no sedimento entre os tempos amostrais foram calculados para TBT, DBT, MBT e OTs, através da diferença entre as concentrações finais e iniciais do período, dividida pelos valores iniciais, sendo expressas em porcentagem. A análise da degradação de organoestânicos foi calculada através do Índice de Degradação de Butilestânicos (BDI; *Butyltin Degradation Index*) (Díez, 2002), através da soma dos produtos de degradação (DBT e MBT) dividido pela concentração de TBT presente no sedimento. Estes índices foram apresentados para sedimento *vegetado* e *não vegetado*, calculados para os três tempos amostrais.

4. Resultados

4.1. Homogeneização e concentrações iniciais de Organoestânicos

As análises da homogeneização do sedimento após fortificação com TBT apresentaram percentuais de variação de 178% e 32% do valor total de organoestânicos entre amostras de diferentes extratos dos frascos avaliados, respectivamente, para os níveis *baixo* e *alto* de fortificação (Tab. 3). Maiores valores de organoestânicos foram encontrados na proximidade do fundo dos frascos. Os teores médios do total de organoestânicos nestes frascos foram de $67,4 \text{ ngSn.g}^{-1}$ (nível *baixo*) e $495,6 \text{ ngSn.g}^{-1}$ (nível *alto*), bem como foram encontrados metabólitos de TBT (nível *baixo* = 13 ngSn.g^{-1} ; nível *alto* = 21 ngSn.g^{-1}). Os valores de organoestânicos quantificados foram 31% e 8% maiores do que os valores nominais desejados, respectivamente, para os níveis *baixo* e *alto* de TBT.

Tabela 3. Valores das análises de homogeneização do sedimento inicial.

Nível de Contaminação	BAIXO				ALTO			
	TBT	DBT	MBT	OTs	TBT	DBT	MBT	OTs
Superfície (ngSn.g^{-1})	19,31	7,98	5,49	32,78	356,93	16,46	6,05	379,45
Meio (ngSn.g^{-1})	29,27	7,91	6,34	43,52	292,43	12,99	5,94	311,36
Fundo (ngSn.g^{-1})	53,58	8,26	5,55	67,40	470,33	20,18	5,09	495,61
Média $\pm$ Desv. Pad. (ngSn.g^{-1})	34,06 $\pm 3,02$	8,05 $\pm 0,06$	5,80 $\pm 0,19$	47,90 $\pm 2,56$	373,23 $\pm 4,66$	16,54 $\pm 0,88$	5,69 $\pm 0,21$	395,47 $\pm 4,68$
Diferença máxima entre camadas (%)	177,5	3,50	1,19	31,24	31,77	22,58	18,82	8,36
Valor Nominal (ngSn.g^{-1})	-	-	-	36,5	-	-	-	365
Diferença entre <i>Concentração Real</i> vs. <i>Concentração Nominal</i> (%)				31				8

Em relação às análises de quantificação de organoestânicos no início do experimento ($n = 3$), observou-se também valores de fortificação maiores do que os valores nominais desejados, em ambos os níveis de TBT testados. Para o nível *baixo*, a concentração real de organoestânicos ($67,4 \pm 7,5 \text{ ngSn.g}^{-1}$), resultou em um valor 84,7% maior do que o nominal planejado ($36,5 \text{ ngSn.g}^{-1}$). Para o nível *alto*, a concentração média obtida após análise ($499,8 \pm 52,05 \text{ ngSn.g}^{-1}$), indicou um valor médio 37% maior do que o nominal (365 ngSn.g^{-1}). Como nas amostras do teste de

homogeneidade, no dia inicial do experimento foram detectados metabólitos - DBT e MBT - no sedimento, sendo que estes totalizaram de 6 a 20% do total de organoestânicos (Fig. 5).

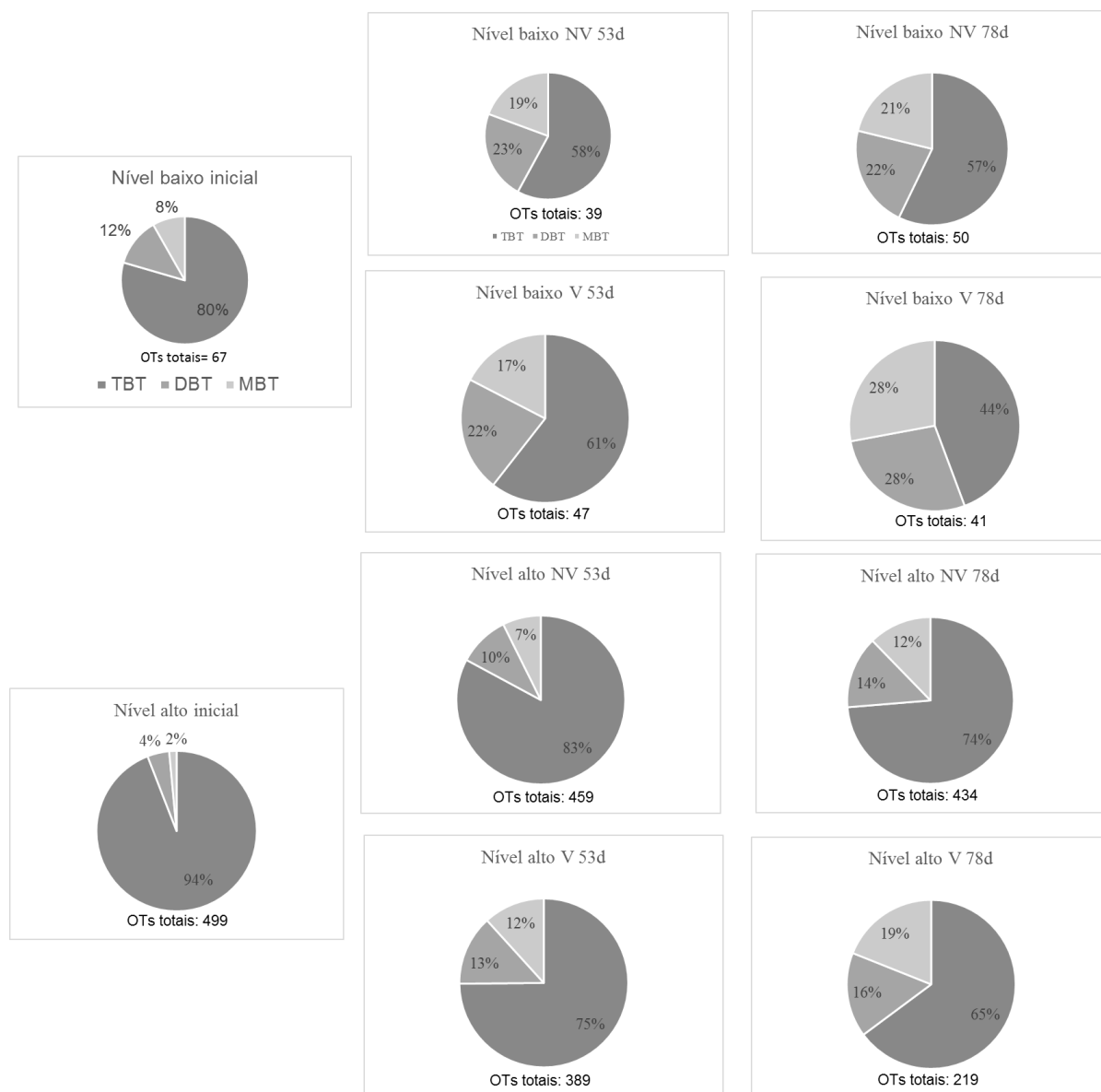


Figura 5. Percentual de organoestânicos (TBT = tributilestanho; DBT = dibutilestanho; MBT = monobutilestanho) em sedimento vegetado (V) e não vegetado (NV) com *Sarcocornia ambigua*, contaminado com duas concentrações diferentes de Sn-TBT (níveis baixo e alto) ao longo de 78 dias de experimento (T0 = início experimento; T1 = 53 dias; T2 = 78 dias).

4.2. Desempenho fitotécnico de *Sarcocornia ambigua* frente a presença de TBT

A temperatura média ($\pm$ desvio padrão) ao longo do bioensaio foi de $16,3^{\circ}\text{C} \pm 3,8$ durante a noite e $34,7^{\circ}\text{C} \pm 2,1$ durante o dia, e a incidência solar média dentro

da estufa durante os 78 dias de experimento foi de 11,96MJ/m²/dia (Estação automática de Rio Grande/INMET).

No início do experimento, não foram observadas diferenças significativas nos valores médios das variáveis biométricas das plantas designadas para os 3 níveis de fortificação de TBT (Figura 6). As médias globais ($\pm$ erros padrões) iniciais de altura dos caules, número de ramificações e comprimento da maior ramificação foram, respectivamente: $9,13 \pm 0,9$ cm; $11,77 \pm 1,65$ ramos; e $1,5 \pm 0,31$ cm.

Ao longo dos 78 dias do experimento, não houve registro de morte de nenhum indivíduo de *S. ambigua*. As plantas de *S. ambigua* demonstraram um crescimento vigoroso em todos os níveis de exposição ao contaminante (fator tempo; $p < 0,001$), ocorrendo diferenças significativas ($p < 0,05$; Teste LSD) nas médias biométricas entre os três tempos de amostragem (Tab. 4; Figura 6). A análise estatística de medidas repetidas (Tab. 4) mostrou não haver efeito significativo de TBT sobre os parâmetros biométricos altura ($F = 1,38$; $p = 0,269$), número de ramificações ($F = 1,92$; $p = 0,140$) e comprimento da maior ramificação dos caules ($F = 0,62$; $p = 0,651$). Adicionalmente, não foram observadas interações significativas entre o tempo de exposição e teores de TBT no sedimento, indicando que o contaminante não influenciou a forma de crescimento de *S. ambigua*.

Tabela 4. Resultado das ANOVAs bifatoriais de Medidas Repetidas para altura do caule, número de ramificações e comprimento da maior ramificação das plantas de *Sarcocornia ambigua* cultivadas em diferentes concentrações de TBT ao longo de 78 dias de experimento (n=5).

Fatores	GL	Altura			Núm. Ramificações			Comp. Maior Ramificação		
		SQ	F	p	SQ	F	p	SQ	F	p
TBT	2	80,87	1,20	0,336	88,20	1,94	0,186	20,99	0,68	0,527
Erro	12	67,55			45,51			31,08		
Tempo (T)	2	2.319	124,64	0,00	1.638,60	80,68	0,00	660,16	76,10	0,00
TBT x T	4	25,78	1,38	0,269	39,00	1,92	0,14	5,40	0,62	0,651
Erro	24	18,61			20,31			8,67		

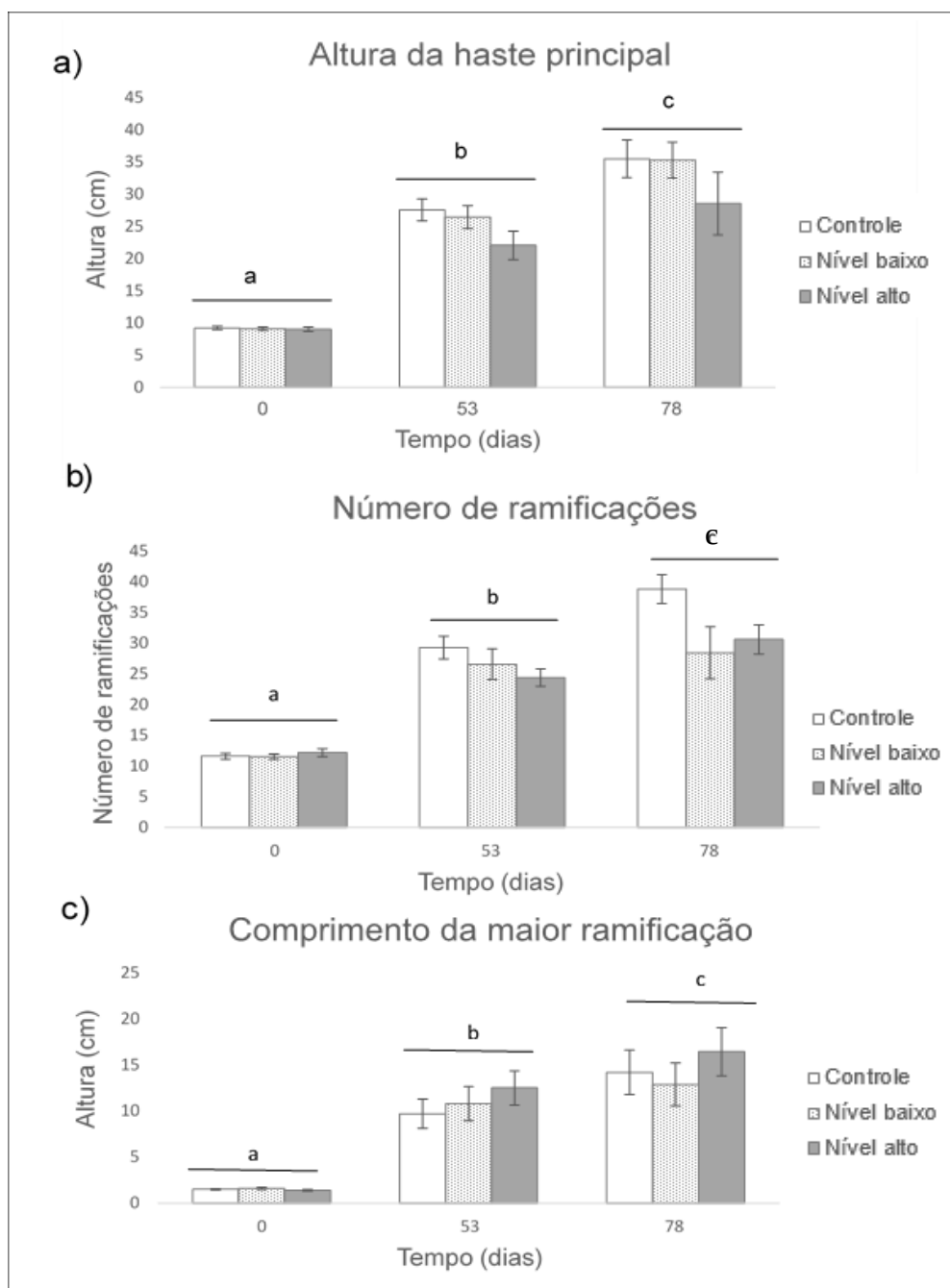


Figura 6. Médias ($\pm$ erros padrões; $n = 5$) das alturas do caule principal (a), número de ramificações (b) e comprimento da maior ramificação (c) de *Sarcocornia ambigua* ao longo dos tempos amostrais 0, 53 dias e 78 dias, em 3 diferentes tratamentos (controle = tratamento sem presença de TBT, nível baixo e nível alto de TBT. Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos dias de cultivo conforme o teste LSD.

O efeito da exposição ao TBT sobre as variáveis biométricas foi também avaliado através de ANOVAs unifatoriais (entre níveis do contaminante) realizadas com os dados do dia 53, quando todas as 30 plantas inicialmente cultivadas ainda

estavam submetidas às condições experimentais (Tab. 5). Mesmo considerando este maior tamanho amostral, nenhum efeito significativo da exposição ao TBT sobre as variáveis biométricas foi observado.

Tabela 5. Média ($\pm$ erro padrão; $n = 10$) aos 53 dias de experimento das variáveis biométricas altura (Alt; cm), número de ramificações (Ram) e comprimento da maior ramificação (Comp; cm) das plantas de *Sarcocornia ambigua* em diferentes níveis de contaminação com TBT (controle = tratamento sem presença de TBT, nível baixo e nível alto de TBT).

Níveis de TBT	n	Alt	Ram	Comp
Controle	10	27,57 $\pm$ 1,71	29,30 $\pm$ 1,85	9,69 $\pm$ 1,57
Nível baixo	10	26,47 $\pm$ 1,71	26,60 $\pm$ 2,52	10,80 $\pm$ 1,85
Nível alto	10	22,06 $\pm$ 2,23	24,40 $\pm$ 1,4	12,50 $\pm$ 1,85
	F (p)	2,317 (0,12)	1,542 (0,23)	0,6435 (0,53)

As taxas de crescimento absoluto do número de ramificações (ramos/30dias) e do alongamento vertical (cm/30dias) de *S. ambigua* foram avaliadas nos períodos amostrais entre 0-53 dias e 53-78 dias (Tab. 6), sendo que para o primeiro período foi possível comparar médias para todas as plantas cultivadas ($n = 30$). ANOVAs unifatoriais realizadas não detectaram diferenças significativas nas taxas de crescimento entre as concentrações do contaminante.

Os resultados de biomassa aérea e subterrânea da *S. ambigua* ao longo do experimento são apresentados na Figura 7. A análise dos resultados estatísticos feitos através de ANOVA bifatorial considerando as biomassas aérea e subterrânea coletadas aos 53 e 78 dias de cultivo não demonstrou efeito nem do tempo e nem do contaminante no desenvolvimento destes parâmetros (Tab. 7).

Quando avaliadas através de ANOVAs unifatoriais, as taxas de crescimento relativo da biomassa aérea fresca (mg/g/dia) (Tab. 8) não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de TBT nos períodos amostrais do experimento.

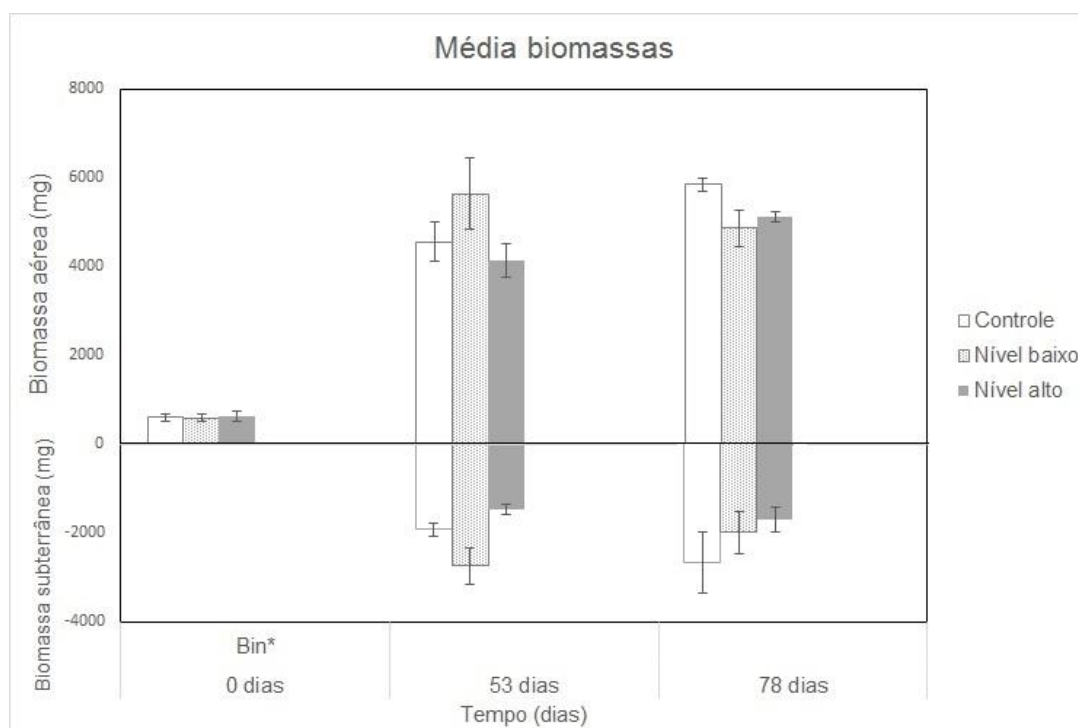


Figura 7. Médias ($\pm$ erro padrão; $n = 5$) das biomassas frescas aéreas e subterrâneas das plantas de *Sarcocornia ambigua* ao longo dos tempos amostrais 0, 53 dias e 78 dias, nos 3 diferentes tratamentos (controle = tratamento sem presença de contaminante, nível baixo e nível alto de TBT ngSn.g^{-1}).

*Bin (Biomassa inicial): biomassa subterrânea não foi coletada no dia zero.

Tabela 6. Médias ($\pm$ erro padrões) das taxas de crescimento absoluto do número de ramificações (Ram; ramos/30 dias) e de alongamento vertical do caule (Crescv; cm/30 dias) das plantas de *Sarcocornia ambigua* entre 0-53 dias (A; n total = 30) e 53-78 dias (B; n total = 15) de cultivo); onde controle = tratamento sem presença de TBT, nível baixo e nível alto de TBT.

A)	Controle	Nível baixo	Nível alto	F	p
Ram	7,81 $\pm$ 1,06	6,45 $\pm$ 1,80	6,45 $\pm$ 1,74	0,24	0,783
Cresv	11,28 $\pm$ 1,27	10,99 $\pm$ 1,18	7,67 $\pm$ 2,02	1,69	0,224

B)	Controle	Nível baixo	Nível alto	F	p
Ram	15,84 $\pm$ 4,40	7,20 $\pm$ 2,31	7,92 $\pm$ 1,35	2,60	0,115
Cresv	8,01 $\pm$ 1,16	8,20 $\pm$ 1,38	6,67 $\pm$ 1,63	0,35	0,707

Tabela 7. Resultado da ANOVA bifatorial para as variáveis biomassa aérea (mg) e biomassa subterrânea das plantas de *Sarcocornia ambigua* cultivadas em diferentes concentrações de TBT aos 53 e 78 dias de experimento.

Fatores	GL	Biomassa aérea (mg)*			Biomassa subterrânea (mg)*		
		SQ	F	p	SQ	F	p
Tempo	1	0,022	2,515	0,126	0,029	1,04	0,319
Tratamento	2	0,008	0,928	0,409	0,070	2,50	0,103
TBT x Tempo	2	0,020	2,319	0,120	0,055	1,94	0,165
Error	24	0,009			0,028		

* $\text{Log}_{10}(x)$

Tabela 8. Médias ($\pm$ erro padrões) das taxas de crescimento relativo da biomassa aérea fresca (mg/g/dia) de *Sarcocornia ambigua* entre 0-53 dias e 53-78 dias de cultivo (n=15), onde controle = tratamento sem TBT, nível baixo e nível alto de TBT.

	Controle	Nível baixo	Nível alto	F	p
53 dias	120 $\pm$ 0,01	150 $\pm$ 0,03	110 $\pm$ 0,01	1,30	0,308
78 dias	110 $\pm$ 0,01	90 $\pm$ 0,006	90 $\pm$ 0,01	0,30	0,303

4.3. Ação remediadora de *Sarcocornia ambigua* em sedimentos contaminados com organoestênicos

Os sedimentos fortificados com o nível *baixo* de TBT mostraram reduções significativas das concentrações médias deste composto e do somatório das formas de organoestênicos totais (OTs) entre os dias 0 e 53 do experimento, mantendo-se estatisticamente semelhantes até os 78 dias (Tab. 9). Nesta última data, os sedimentos *vegetado* e *não vegetado* apresentaram, respectivamente, 66,3% e 46,6% de redução nas concentrações de TBT. Antagonicamente, as concentrações dos metabólitos de TBT aumentaram ao longo do experimento, mais particularmente para o MBT, que apresentou médias de 90,8% (vasos *não vegetados*) a 105,1% maiores (vasos *vegetados*) aos 78 dias do que no início experimento. Os valores finais de DBT nos sedimentos *vegetado* e *não vegetado* foram, respectivamente, 31,2% e 37% maiores do que em T0.

Tabela 9. Médias ($\pm$ erro padrão) das concentrações de organoestânicos em sedimento fortificado com o nível baixo e nível alto de TBT (com e sem a presença de *Sarcocornia ambigua*), coletados aos 0, 53 e 78 dias do experimento. TBT = Tributilestanho (ngSn.g^{-1}); DBT = dibutilestanho (ngSn.g^{-1}); MBT = monobutilestanho (ngSn.g^{-1}) e OTs = organoestânicos totais (ngSn.g^{-1}). Letras maiúsculas diferentes ao longo das linhas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de cultivo, segundo o teste LSD (ANOVAs unifatoriais). Para cada nível de fortificação, letras minúsculas diferentes entre concentrações de cada organoestânico indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os vasos vegetados e não vegetados de *S. ambigua* nos tempos amostrais 53 e 78 dias, segundo o teste LSD (as cores de fundo na tabela visam apenas auxiliar na visualização dessas ANOVAs bifatoriais).

Tratamento		Tempo amostral (dias)		
Nível baixo		0	53	78
TBT (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$53,58 \pm 5,19^B$	$22,77 \pm 4,35^A$	$28,6 \pm 2,53^A$
	VEGETADO		$28,44 \pm 4,51^A$	$18,06 \pm 1,12^A$
DBT (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$8,26 \pm 0,49^A$	$8,92 \pm 0,18^{AB}$	$10,84 \pm 1,02^B$
	VEGETADO		$10,35 \pm 0,34^{AB}$	$11,32 \pm 1,16^B$
MBT (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$5,55 \pm 0,85^A$	$7,61 \pm 0,53^{ABa}$	$10,59 \pm 1,34^{Bb}$
	VEGETADO		$8,17 \pm 1,54^{ABab}$	$11,38 \pm 0,87^{Bab}$
OTs (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$67,4 \pm 4,7^B$	$39,29 \pm 4,12^A$	$50,03 \pm 4,33^A$
	VEGETADO		$46,97 \pm 5,74^A$	$40,76 \pm 2,35^A$
Nível alto		0	53	78
TBT (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$470,33 \pm 33,2^C$	$381,07 \pm 33,47^{Cb}$	$320,26 \pm 74,22^{Cb}$
	VEGETADO		$291,7 \pm 44,95^{Bb}$	$142,02 \pm 0,92^{Aa}$
DBT (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$22,06 \pm 6,65^A$	$45,08 \pm 7,40^{Bab}$	$60,95 \pm 9,71^{Bb}$
	VEGETADO		$52,35 \pm 5,61^{Cab}$	$35,52 \pm 1,48^{Ba}$
MBT (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$7,44 \pm 6,95^A$	$33,75 \pm 5,03^{Ba}$	$53,36 \pm 4,81^{Cb}$
	VEGETADO		$45,73 \pm 1,27^{Bab}$	$41,52 \pm 5,24^{Bab}$
OTs (ngSn.g^{-1})	NÃO VEGETADO	$499,83 \pm 29,74^B$	$459,9 \pm 35,71^{Bb}$	$434,57 \pm 85,73^{Bb}$
	VEGETADO		$389,78 \pm 51,54^{Bb}$	$219,06 \pm 4,82^{Aa}$

No nível *baixo* de TBT, ANOVAs bifatoriais entre médias dos organoestânicos nos sedimentos entre 53 e 78 dias de experimento detectaram um aumento significativo dos teores globais de MBT (*vegetados* e *não vegetados*, em conjunto) nos últimos 25 dias (Tab. 10). Uma interação estatisticamente significativa ($p = 0,04$) foi detectada entre os tratamentos *tempo* e *vegetação* para o composto TBT, devido a uma maior magnitude de redução nos vasos com *S. ambigua* do que nos vasos *não vegetados* (Tab. 9).

No nível *alto* de TBT, a presença das plantas de *S. ambigua* afetou marcadamente a degradação dos organoestânicos nos sedimentos fortificados (Tab. 9). As concentrações de TBT e OTs no sedimento *não vegetado* não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre o início e o final do experimento. Já no sedimento *vegetado*, observa-se redução estatisticamente significativa nos três tempos amostrais (Tab. 9). O percentual de redução de TBT entre a concentração inicial e final para o sedimento *não vegetado* foi de 31,9%, enquanto que, para o sedimento *vegetado*, esta redução foi de 69,8%. No mesmo período, o percentual de redução dos OT totais nos sedimentos *vegetados* e *não vegetados* foram, respectivamente, de 56% e 13%.

O metabólito DBT apresentou resultados distintos entre os tratamentos *vegetado* e *não vegetado* no nível *alto*. Sem a presença de *S. ambigua*, as médias menores foram observadas no início do experimento, havendo aumento significativo aos 53 dias, mantendo-se com médias estatisticamente iguais até o final do experimento. O sedimento *vegetado* apresentou uma flutuação dos valores médios de DBT, com um aumento até o dia 53 seguido por uma redução aos 78 dias de experimento (Tab. 9). Adicionalmente, ao final do bioensaio, as concentrações de DBT do sedimento *não vegetado* aumentaram cerca de três vezes mais (176,3% do valor inicial) do que no sedimento *vegetado* (61,3% do valor inicial).

No nível alto de fortificação, o metabólito MBT respondeu de forma distinta ao DBT. Nos sedimentos *não vegetados* ocorreu um aumento significativo na concentração do MBT entre os tempos amostrais, enquanto na presença de *S. ambigua* não ocorreu diferença entre médias dos dias 53 e 78 (Tab. 9). Os acréscimos percentuais de MBT no sedimento ao longo dos 78 dias do experimento foram de 617% em vasos *não vegetados* e de 458% em vasos *vegetados*.

As ANOVAs bifatoriais entre 53 e 78 dias para os sedimentos fortificados com o nível alto de TBT confirmam uma redução significativa da concentração média

global de TBT no final do experimento, além de uma redução significativamente maior de TBT e de OTs, tanto em vasos com a presença de *S. ambigua* como sem a planta (Tab. 11; Fig. 8). A análise *post hoc* das médias (Teste LSD) demonstrou concentrações menores em vasos vegetados aos 78 dias de experimento (Tab. 9). As ANOVAs bifatoriais de DBT e MBT encontraram interações significativas entre os fatores *tempo* e *vegetação* (Fig. 9; Fig. 10), devido a reduções aos 78 dias nos teores médios desses compostos nos vasos *vegetados* e aumento dos mesmos nos vasos *não vegetados* (Tab. 11). Adicionalmente, um aumento significativo de MBT ocorreu no sedimento *não vegetado* ao final do experimento (Teste LSD; Tab. 9).

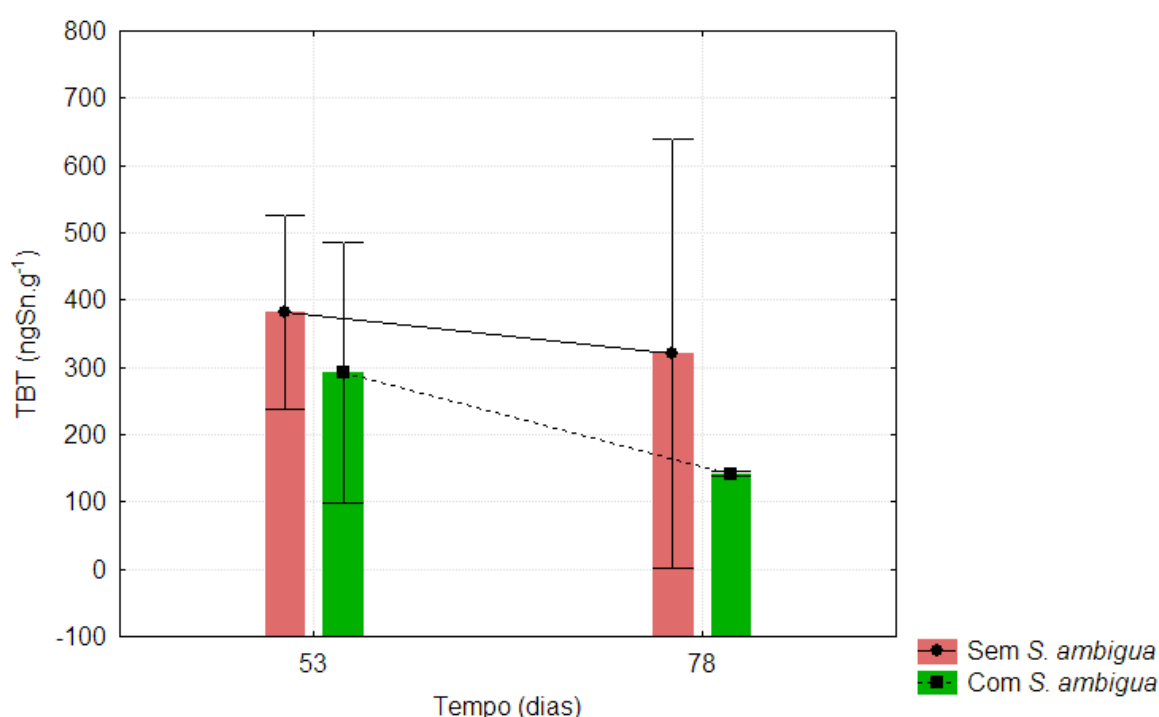


Figura 8. Visualização da ausência de interação significativa na concentração de TBT no sedimento (ngSn.g⁻¹) entre o tempo amostral (53 e 78 dias) e tratamento presença de indivíduos de *S. ambigua* cultivados em contaminação de nível alto de TBT.

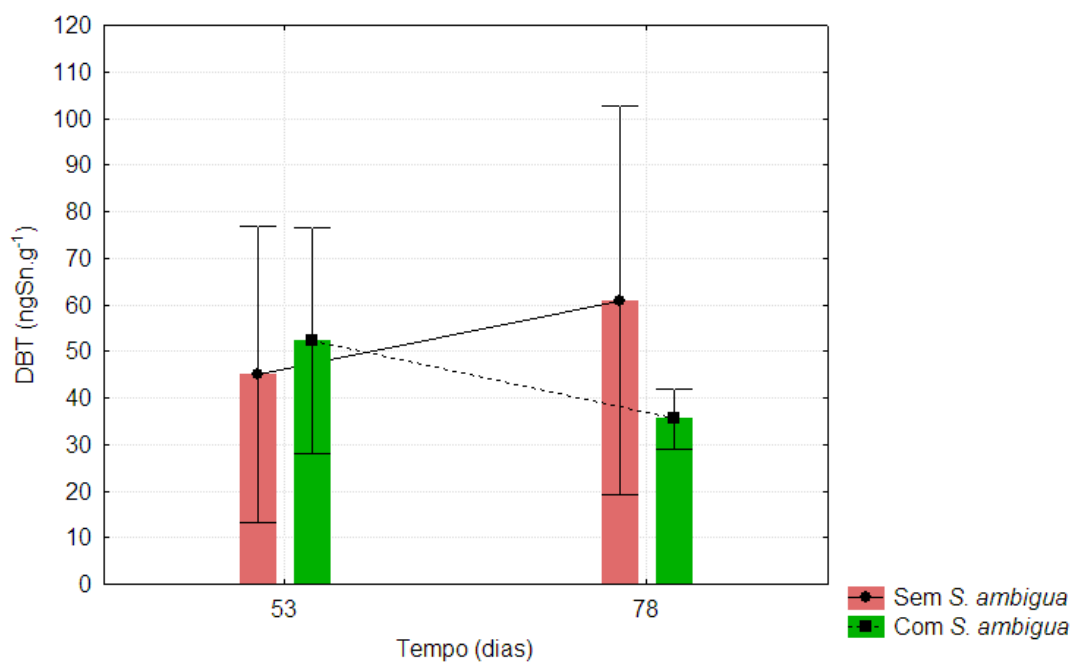


Figura 9. Visualização da interação significativa na concentração de DBT no sedimento (ngSn.g⁻¹) entre tempo amostral (53 e 78 dias) e tratamento presença de indivíduos de *S. ambigua* cultivados em contaminação de nível alto de TBT.

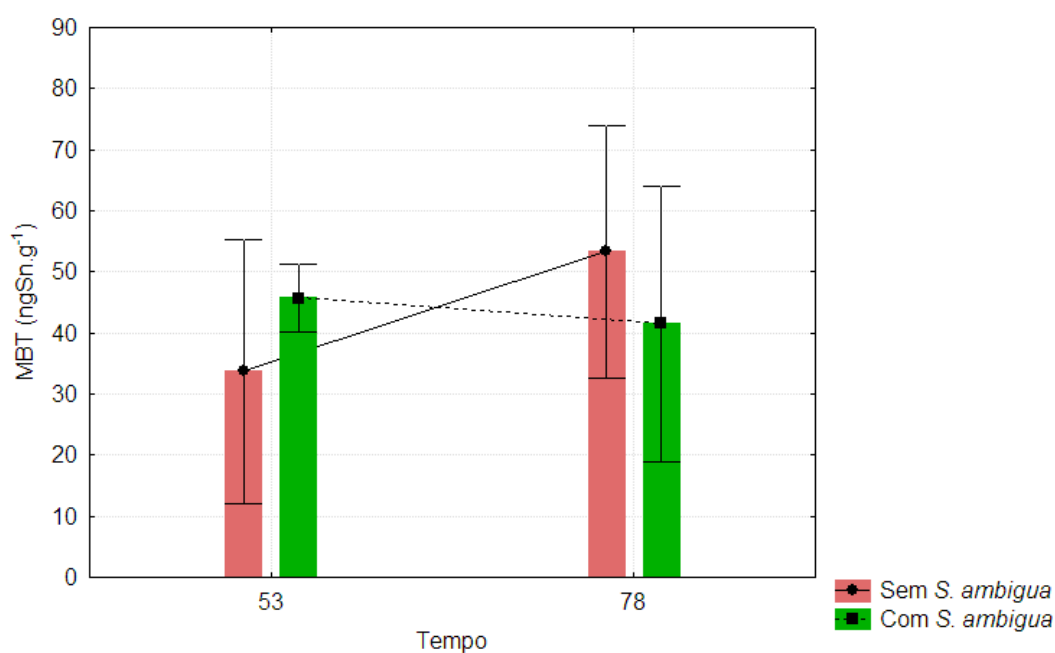


Figura 10. Visualização da interação significativa na concentração de MBT no sedimento (ngSn.g⁻¹) entre tempo amostral (53 e 78 dias) e tratamento presença de indivíduos de *S. ambigua* cultivados em contaminação de nível alto de TBT.

A análise dos Índices de Degradação de Butilestânicos (BDI, *Butyltin Degradation Index*) indicou uma menor ocorrência de degradação de organoestânicos em sedimentos fortificados com o nível alto de TBT *sem S. ambigua*.

Os organoestânicos do sedimento na presença de *S. ambigua* mostrou um aumento da degradação ao longo dos 78 dias, tanto no nível *baixo* quanto no nível *alto* de TBT. O BDI dos sedimentos do nível baixo sem plantas de *S. ambigua* permaneceu estável nos últimos 25 dias. (Fig. 11).

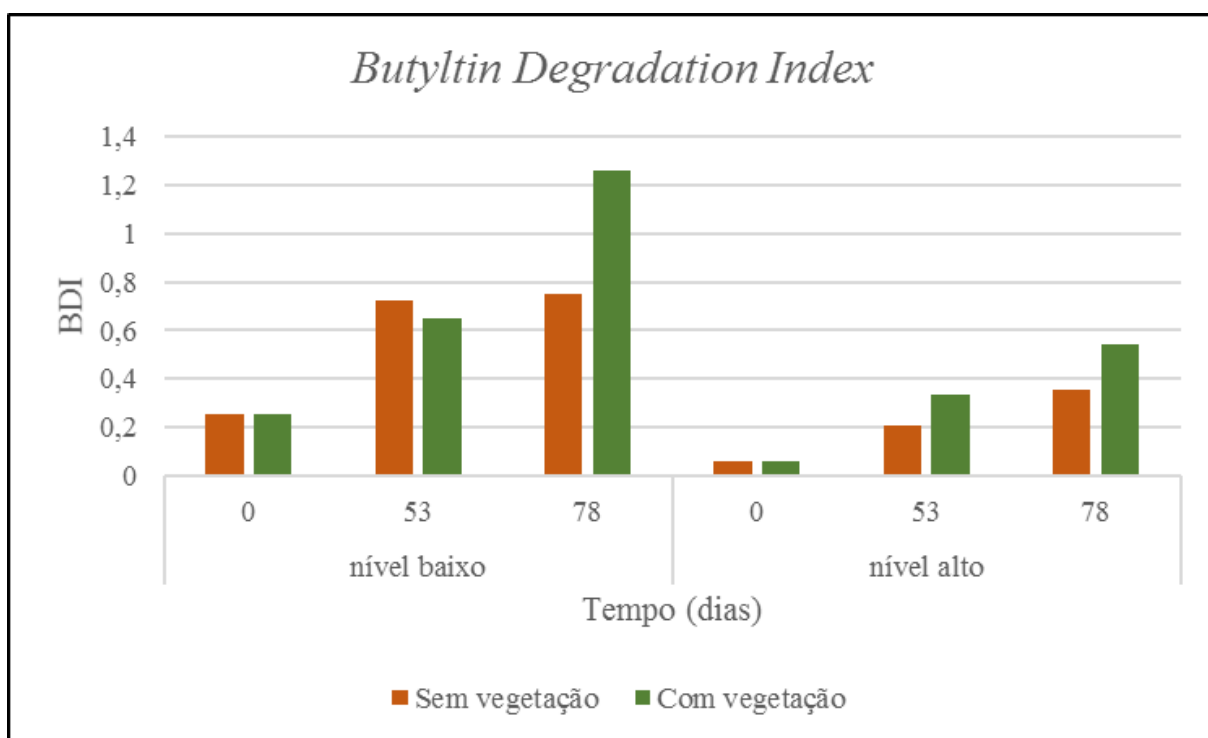


Figura 11. BDI (*Butyltin Degradation Index*) de sedimentos com níveis de contaminação *baixo* e *alto* de TBT, monitorados por 78 dias com e sem a presença de *S. ambigua*.

Tabela 10. Resultados das análises de variância das concentrações de TBT, DBT e MBT em sedimento no tratamento de nível baixo de TBT, com e sem presença de *S. ambigua*, coletados aos 53 e 78 dias de cultivo.

Fatores	GL	TBT				DBT				MBT				Sn Total			
		MQ	F	p	SQ%	MQ	F	p	SQ%	MQ	F	p	SQ%	MQ	F	p	SQ%
Tempo (T)	1	0,14	0,433	0,529	2,9	0,13	3,393	0,103	25,3	0,71	7,023	0,029	45,8	0,09	0,307	0,594	2,5
Vegetação (V)	1	0,20	0,598	0,462	4,0	0,06	1,588	0,243	11,8	0,03	0,283	0,609	1,8	0,01	0,027	0,873	0,2
T x V	1	1,98	5,995	0,040	39,9	0,02	0,439	0,526	3,3	0,00	0,017	0,900	0,1	1,16	3,753	0,089	31,1
Erro	8	0,33			53,2	0,04			59,6	0,10			52,2	0,31			66,2

Tabela 11. Resultados das análises de variância das concentrações de TBT, DBT e MBT em sedimento no tratamento de nível alto de TBT, com e sem presença de *S. ambigua*, coletados aos 53 e 78 dias de cultivo.

Fatores	GL	TBT				DBT				MBT				Sn Total			
		MS	F	p	%	MS	F	p	%	MS	F	P	%	MS	F	p	%
Tempo (T)	1	35,71	6,780	0,031	26,3	0,02	0,031	0,866	0,2	1,00	3,044	0,119	16,3	23,86	4,576	0,065	19,7
Vegetação (V)	1	50,47	9,583	0,015	37,1	1,14	1,676	0,232	10,7	0,01	0,027	0,874	0,1	42,96	8,239	0,021	35,5
T x V	1	7,70	1,462	0,261	5,7	4,04	5,932	0,041	37,9	2,51	7,645	0,024	40,8	12,38	2,374	0,162	10,2
Erro	8	5,27			31,0	0,68			51,2	0,33			42,7	5,21			34,5

De modo geral, a forma de organoestânico mais representativa na porcentagem final de todos os tratamentos impostos permaneceu sendo TBT. Os sedimentos fortificados com o nível *baixo* de TBT apresentaram maiores percentuais de metabólitos, principalmente os sedimentos *com S. ambigua* após 78 dias de cultivo, onde os metabólitos representaram 56% dos OTs (Fig. 5). No nível *alto*, os metabólitos corresponderam a apenas 6% dos OTs no início do experimento, e na presença de vegetação esta proporção alcançou 35% dos OTs ao final dos 78 dias. Assim, para ambos os níveis de contaminação, uma maior degradação de TBT e, consequentemente, surgimento de metabólitos esteve associada a presença de *S. ambigua*.

5. Discussão

5.1. Homogeneização e concentrações iniciais de Organoestânicos

Após as análises químicas, a homogeneização dos frascos demonstrou distribuição heterogênea de TBT ao longo do seu eixo vertical. Entretanto, o mesmo padrão de heterogeneidade não foi tão marcado para seus metabólitos, DBT e MBT. Não foram encontrados dados na literatura que permitissem confrontar os resultados de homogeneização do presente estudo com outros desenvolvidos, uma vez que a maioria das análises de organoestânicos são feitas em sedimentos coletados *in situ*, sem haver necessidade de fortificação prévia. Frequentemente bioensaios de toxicidade do TBT não avaliam as concentrações reais dos solos fortificados e apresentam apenas seus resultados em relação aos valores nominais estimados (Silva *et al.*, 2014). Uma alternativa à heterogeneidade do eixo vertical pode ser decorrência de lixiviação de compostos para o fundo do frasco, após a retirada do sedimento da situação de congelamento - no início da montagem experimental -, quando os mesmos foram mantidos em temperatura ambiente e na posição vertical. Assim, o descongelamento na posição vertical poderia ter resultado em lixiviação dos compostos organoestânicos e/ou da matéria orgânica particulada fina que compunha o sedimento para o fundo do recipiente. Uma possível concentração da matéria orgânica do sedimento no fundo do frasco poderia ter influenciado a distribuição de TBT, da mesma maneira que foi observado em ambientes terrestres e aquáticos, devido às características lipofílicas e capacidade de adsorção deste composto na própria matéria orgânica (Hoch & Schwesig, 2004).

As amostras coletadas no início do experimento, tanto para caracterização da homogeneidade do eixo vertical dos frascos, quanto dos organoestânicos presentes no sedimento, mostraram a ocorrência de produtos de degradação de TBT (DBT e MBT). Pode-se afirmar que o surgimento destes compostos se deu por processos ocorridos durante ou após a fortificação, uma vez que a solução utilizada para *spiking* foi analisada, demonstrando haver apenas TBT. Esta degradação de TBT pode ter ocorrido durante o processo de rolamento e mistura da fortificação, porém mais provavelmente no congelamento e descongelamento/liofilização - após 4 meses do término do experimento - para análise química dos organoestânicos das amostras de sedimento.

Fatores abióticos que afetam as taxas de degradação de TBT, como a temperatura (Francois *et al.*, 1989; Brosillon *et al.*, 2014), disponibilidade de oxigênio

no sedimento e pH (Sakultantimetha *et al.*, 2010) são relevantes no surgimento de DBT e MBT (Du *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2015), e podem ter potencializado processos iniciais de degradação deste composto. Além disso, fatores bióticos como comunidades bacterianas já existentes no sedimento são capazes de favorecer a degradação de TBT (Sakultantimetha *et al.* 2010).

As discrepâncias entre concentrações iniciais reais e nominais de TBT no sedimento foi maior no *nível baixo* de fortificação de TBT (31% acima) do que para o *nível alto* (8% acima). As concentrações reais de TBT observadas no sedimento do experimento, 67,4 ngSn.g⁻¹ para o nível baixo, e 499,83 ngSn.g⁻¹ para o nível alto, encontram-se entre valores possíveis de serem encontrados nas regiões costeiras do Brasil. Santos *et al.* (2011) revisaram o estado dos organoestânicos na zona costeira brasileira, encontrando concentrações de até 438 ngSn.g⁻¹ em regiões do nordeste brasileiro (Estado da Bahia; Baía de Todos-os-Santos). Concentrações mais expressivas de TBT, de até 2.796 ngSn.g⁻¹, também foram evidenciadas por Santos *et al.* (2011) em um complexo estuarino da região sul, em Paranaguá (Estado do Paraná). Santos *et al.* (2016) apresentaram dados de composição de organoestânicos no sedimento de oito ecossistemas estuarinos da região sul e sudeste do Brasil, e atestaram a existência de concentrações de OTs variando entre 19 ngSn.g⁻¹ e 568 ngSn.g⁻¹. Na desembocadura da Lagoa dos Patos (RS) foram encontrados, em quatro sítios distintos, gastrópodes com expressão do efeito *imposex*, biomarcador da presença de TBT (Smith, 1981; Castro & Fillmann, 2012), com concentrações de organoestânicos em seus tecidos entre 15,9 ngSn.g⁻¹ e 309 ngSn.g⁻¹ (Castro *et al.* 2012b). As concentrações de organoestânicos testadas ao longo do presente bioensaio com *S. ambigua* - e encontradas em estuários brasileiros - são potencialmente capazes de acarretar efeitos adversos à biota.

5.2. Toxicidade de organoestânicos no desenvolvimento de *Sarcocornia ambigua*

Indivíduos de *S. ambigua* apresentaram elevada tolerância às concentrações dos organoestânicos (*nível baixo* e *alto*) às quais foram expostos. A toxicidade aos organoestânicos foi avaliada através de parâmetros fitotécnicos das plantas (crescimento vertical, ramificação e formação de biomassa) ao longo do período experimental, que não foram estatisticamente diferentes dos indivíduos do tratamento *controle* (sem contaminação). Não houve mortalidade de nenhuma *S.*

ambigua, nem foram observadas nas plantas características visíveis de toxicidade, como perda de ramificações ou prostração de caules. A análise do desenvolvimento de *S. ambigua* em dois períodos amostrais (0-53 dias e 53-78 dias) mostrou um maior crescimento vertical das plantas no início do estudo e uma maior ramificação dos caules próximo do início da floração. Este é um padrão de desenvolvimento característico de *S. ambigua* (Costa & Herrera, 2016; Doncato & Costa, 2017), e os dados sugerem não ter ocorrido limitação por espaço ou esgotamento de nutrientes, que possa ter mascarado a toxicidade de TBT ao longo dos 78 dias de cultivo. O gênero *Sarcocornia* demonstra tolerância a organoestânicos (Carvalho *et al.*, 2010), sendo verificada sua ocorrência em regiões com a presença destes compostos. Também é reconhecida a tolerância de espécies deste gênero a outras formas de contaminantes, como hidrocarbonetos, pesticidas, metais pesados e compostos poliaromáticos (PAHs) (Joshi *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2008; Negrin *et al.*, 2017).

Em bioensaio desenvolvido com condições de contaminação de TBT e ambiente de cultivo muito semelhantes ao presente estudo, Carvalho (2017) mostrou que a grama halófito *Spartina alterniflora* também não teve taxas de desempenho fitotécnico, como perfilhamento, natalidade e expansão foliar, afetadas pela exposição ao TBT. Segundo Francois *et al.* (1989), plantas da fanerógama marinha *Zostera marina* (L.), submetidas a concentrações entre 1.507 e 5.315 ngSn.g⁻¹ (originalmente 550 e 1.940 ngTBT.g⁻¹) não apresentaram efeitos adversos a esses níveis de contaminação. Similarmente, Novak & Trapp (2005), ao avaliarem 38 espécies vegetais - incluindo halófitas - crescendo em sedimento oriundo de dragagem, com concentrações variando entre 4.384 e 117.820 ngSn.g⁻¹ (originalmente 1.600 e 43.000 ngTBT.g⁻¹), observaram igual ausência de toxicidade nas plantas. Nossos resultados e os estudos citados acima evidenciam que concentrações de organoestânicos tóxicas para plantas superiores são claramente muito maiores do que as que causam efeitos adversos em gastrópodes e peixes (Smith, 1981; Gibbs & Bryan, 1987; Williams *et al.*, 1994; Castro & Fillmann, 2012). A tolerância de *S. ambigua* às concentrações distintas de TBT e seus metabólitos atende ao primeiro requisito para escolha e determinação de uma espécie como fitorremediadora (Barceló & Poschenrieder, 2003; Moosavi & Seghatoleslami, 2013).

5.3. Ação remediadora de *Sarcocornia ambigua* em sedimentos contaminados com organoestânicos

Nos dois níveis de contaminação avaliados, o processo de degradação de organoestânicos com a formação dos metabólitos DBT e MBT foi detectado já aos 53 dias de cultivo, independentemente da presença da halófito *S. ambigua*. Entretanto, nos últimos 25 dias de experimento, as plantas promoveram reduções significativamente maiores nas concentrações médias de TBT e OTs nos sedimentos contaminados com o nível *alto* de TBT, quando comparadas com as concentrações nos sedimentos controle *não vegetados*. No todo, a presença de *S. ambigua* resultou em uma degradação 219% maior de TBT no nível *alto* de contaminação (de 470,33 para 142,02 ngSn.g⁻¹) do que em vasos controle *não vegetados* (reduzido a 320,26 ngSn.g⁻¹) após 78 dias de crescimento. Ficou evidente a ação fitorremediadora de *S. ambigua* sobre as concentrações de TBT no sedimento. Adicionalmente, a presença das plantas resultou em reduções nas concentrações dos metabólitos DBT (significativa) e MBT nos últimos 25 dias do experimento, não observadas em sedimentos controle *não vegetados*, sendo esses processos evidenciados por interações *tempo X vegetação* significativas das ANOVAs bifatoriais. Esta mesma ação fitorremediadora não foi observada nos sedimentos contaminados com o nível *baixo* de TBT.

O contraste dos resultados nos níveis *baixo* e *alto* de TBT indica uma possível dependência, no processo de fitorremediação por *S. ambigua*, do contato com o contaminante, que é mais provável quanto maior a concentração do composto e maior o tamanho da planta na área contaminada. Lespes *et al.* (2009) também indicaram haver dependência entre as taxas de degradação de organoestânicos (TBT e trifenilestanho-TPhT; último organoestânico biocida utilizado na agricultura) por plantas de alface (*Lactuca sativa* var. capitata) e as concentrações iniciais no sedimento desses compostos. Em condições laboratoriais, quanto menor as concentrações dos compostos, menor foi a influência das plantas de alface, por ação direta ou indireta, na alteração das proporções dos contaminantes e seus metabólitos. Lespes *et al.* (2003) avaliaram as concentrações de TBT e TPhT em cultivo de vagem e batata em dois tipos distintos de sedimento preparado: um fortificado com uma solução de 20 ngSn.L⁻¹ e outro com uma pequena parcela de lodo originário de esgoto (com concentrações iniciais de TBT de, aproximadamente,

470 ngSn.g⁻¹). Ao final do experimento, estes pesquisadores constataram a dependência da concentração inicial de organoestânicos na concentração final, tanto do sedimento quanto dentro do tecido dos vegetais, onde maiores concentrações resultaram em maior degradação e/ou incorporação. Mais recentemente, Carvalho (2017) também demonstrou que a ação fitorremediadora da grama *S. alterniflora* sobre sedimento contaminado com TBT era significativa quando as plantas alcançavam um maior desenvolvimento foliar e enraizamento.

A ação degradadora de TBT da presença de *S. ambigua* em sedimentos contaminados foi observada em outras halófitas. Carvalho *et al.* (2010) encontraram maiores quantidades de produtos de degradação de TBT, em sedimentos de marismas de Portugal, quando associados à presença das halófitas *Sarcocornia fruticosa* e *Spartina maritima*. Estes mesmos autores demonstraram, em um bioensaio de laboratório ao longo de 9 meses, que a presença de *Halimione portulacoides* propiciou reduções até 40% maiores nas concentrações de organoestânicos no sedimento em relação a sedimentos não vegetados. No final de nosso bioensaio, os vasos com *S. ambigua* apresentaram maiores valores do Índice de Degradação de Butilestânicos (BDI) em relação aos *não vegetados* - características de um sedimento aparentemente mais “envelhecido” -, com uma maior proporção entre os metabólitos DBT e MBT em relação à quantidade total de TBT (Díez *et al.*, 2002).

A forma como *S. ambigua* aumenta a degradação de TBT no sedimento não é clara. Esta degradação pode ter sido realizada de forma indireta, devido à presença de *S. ambigua* e suas conseqüentes alterações nas características físico-químicas e da comunidade biológica do sedimento (Martins *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010); ou de forma direta, por incorporação do contaminante na matriz vegetal, e metabolização destes compostos (Carvalho *et al.*, 2010), como é relatado por Francois *et al.* (1984) para a fanerógama marinha *Zostera marina* ou por Lespes *et al.* (2009) para plantas de alface.

A fitorremediação indireta dos compostos pode ter ocorrido através de a) alteração de condições físico-químicas do sedimento; b) estimulação da comunidade microbiana associada à rizosfera, promovendo a imobilização de compostos no sedimento pela diminuição da percolação e/ou lixiviação (Abhilash *et al.*, 2009; Moosavi & Seghatoleslami, 2013) e/ou de c) degradação de compostos na região da rizosfera associada à comunidade microbiana (Anderson *et al.*, 1993; Susarla *et al.*,

2002; Barceló & Poschenrieder, 2003; Coutinho & Barbosa, 2007; Moosavi & Seghatoleslami, 2013). A aeração do sedimento pelas raízes pode diminuir a persistência ambiental de organoestânicos, uma vez que sedimentos anóxicos podem “estocar” TBT por vários anos (Dowson *et al.*, 1996). Mudanças ou (fito)estimulação da comunidade microbiana decorrente da liberação de exsudatos por parte da planta modificam as características químicas da rizosfera e regiões adjacentes (Reichenauer & Germida, 2008; Carvalho *et al.*, 2010).

A capacidade de *S. ambigua* em absorver e metabolizar compostos organoestânicos não foi avaliada no presente trabalho. Entretanto, ao final do bioensaio, uma redução significativa de OTs ocorreu no sedimento *vegetado* com *alto* nível de contaminação de TBT. Diferente do sedimento *não vegetado*, onde a degradação de TBT resultou em acúmulo de MBT ao longo de todo o bioensaio, no sedimento *vegetado* as concentrações de MBT reduziram no período final de maior desenvolvimento da *S. ambigua*. Sabe-se que a natureza de MBT não se assemelha à de TBT e DBT, principalmente em relação à lipofilicidade, solubilidade em água e capacidade de adsorção (Antizar-Ladislao, 2008). Este fato foi evidenciado por Novak & Trapp (2005), que associaram a alta solubilidade de MBT com maiores taxas de translocação deste composto do sedimento dragado rico em TBT para as partes aéreas de espécies de um “mix” de trevos (gênero *Trifolium*) e gramíneas. Lespes *et al.* (2003) também verificou uma maior transferência de MBT em cultivares de vagem. Assim, a degradação de TBT ao final do experimento em sedimento com alto nível deste contaminante, mas a ausência de maiores concentrações de seu metabólito, MBT, neste mesmo período, sugerem uma ação direta por parte de *S. ambigua* na fitorremediação deste composto e possível incorporação do mesmo em seu tecido vegetal. Futuras análises dos tecidos de plantas desta espécie cultivadas em sedimentos ricos em TBT poderão confirmar esta hipótese.

O potencial fitorremediador do gênero *Sarcocornia* é conhecido para diversos fins, demonstrando sua capacidade em absorver e acumular metais (Joshi *et al.*, 1987; González-Alcarez *et al.*, 2011; Idaskin *et al.*, 2017; Negrin *et al.*, 2017), compostos orgânicos poliaromáticos (Martins *et al.*, 2008), ou até mesmo NaCl de sedimentos salinizados (Rozema & Schat, 2013; Costa & Bonilla, 2016). Além disso, para alguns compostos, o gênero é classificado como *hiperacumulador* (Barceló & Poschenrieder, 2003; Ozawa *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013), uma vez que apresentam capacidade de acumulação destes compostos em proporções de mais de 1% do seu

peso seco (Eslamzadeh, 2006; Smillie, 2015). Assim, o caminho metabólico na matriz vegetal, bem como a possível degradação de organoestânicos em seu interior são questões que devem ser avaliadas.

Nos dois níveis de contaminação testados, observou-se uma rápida metabolização de TBT nos primeiros 53 dias - durante o período de estabelecimento das plantas de *S. ambigua* nos vasos -, com o aumento das frações de DBT e MBT e dos valores do índice BDI, sugerindo um importante papel de microrganismos na degradação de TBT, tanto em sedimentos dos vasos *vegetados* como dos *não vegetados*. Estudos em laboratório mostraram que algumas bactérias, tais como *Enterobacter cloacae* (Sakultantimetha *et al.*, 2010) e *Aeromonas molluscorum* Av27 (Silva *et al.*, 2014), demonstram resistência ao TBT e têm habilidade de remover o TBT de solos, a partir da utilização deste composto como fonte de carbono e transformação em seus metabólitos, como o DBT e MBT. Outra espécie conhecida por realizar a degradação de organoestânicos é o fungo amplamente distribuído em solos costeiros e continentais, *Cunninghamella elegans*. Bernat *et al.* (2013) realizaram uma cultura mista - contendo cepas de *Cunninghamella elegans* e *Cochliobolus lunatus* -, que degradaram TBT e diminuíram em até 10x a toxicidade para cultivos de larvas de *Artemia*, em apenas 12 dias de incubação. Os processos mediados por microrganismos citados acima foram os possíveis determinantes da degradação de TBT nos sedimentos *não vegetados* e no início do crescimento das *S. ambigua* nos vasos.

6. Conclusão

Os níveis testados de TBT, equivalentes aos encontrados em sedimentos costeiros ao longo da costa brasileira, não resultaram em toxicidade para plantas de *S. ambigua* ao longo do período do bioensaio.

Plantas de *S. ambigua* plenamente desenvolvidas foram capazes de reduzir a concentração de TBT em sedimentos contaminados, bem como de seus metabólitos. Entretanto, o efeito fitorremediador parece ser dependente da concentração do contaminante no sedimento, com uma maior probabilidade de contato com a rizosfera e degradação ocorrendo em altos teores de TBT.

Uma vez que foi verificada a ocorrência de fitorremediação, tornam-se imprescindíveis estudos que quantifiquem e qualifiquem a presença de organoestânicos na matriz vegetal de *S. ambigua*. É importante verificar se esta espécie é capaz de absorver, acumular e/ou degradar tais compostos em seus tecidos e, se o for, quais os processos que regem esta metabolização. Da mesma forma, é igualmente relevante a análise da rizosfera e sua comunidade microbiana, para o entendimento dos processos de degradação dos compostos organoestânicos. O estudo da compartimentação de organoestânicos, ou seja, da sua distribuição no sedimento, parte subterrânea e aérea vegetal permitirá a criação de um mosaico do destino destes compostos na natureza.

A utilização de plantas para remediação vem se estabelecendo como uma técnica viável, de baixo custo, e alta efetividade. A utilização da halófita *S. ambigua* para fitorremediação de TBT surge como uma possibilidade de implementação em regiões costeiras e portuárias ao longo de toda costa brasileira, onde está naturalmente distribuída. Estudos *in situ* também são necessários para testar as potencialidades de utilização da *S. ambigua* como espécie fitorremediadora de organoestânicos.

Plantas de *S. ambigua* - multiplicadas em viveiros - ou sementes/propágulos vegetativos - obtidos em ambientes naturais e multiplicados em estufa - podem ser transplantados para áreas previamente caracterizadas com alto grau de contaminação de organoestânicos. As plantas, após determinado período de crescimento, podem ser submetidas a poda, uma vez que *S. ambigua* é perene e apresenta capacidade de rebrota. Desta forma, o contaminante pode ser removido do ambiente, sendo dado o destino adequado à biomassa, como, por exemplo, produção de biodiesel através de hidrólise enzimática (visto que há possibilidade de

as plantas apresentarem contaminante em sua matriz vegetal). Uma vez detectada a hipótese de que a planta possa estar degradando o composto e liberando-o de alguma forma para o meio, outras alternativas de manejo das áreas a serem descontaminadas devem ser avaliadas. Adicionalmente, se verificado que o processo associado à quebra de organoestênicos for a *fitodegradação*, não haverá necessidade de retirada da planta, já que a mesma irá propiciar o surgimento de formas menos tóxicas. A descontaminação de ambientes passa a ser ineficaz se novos aportes de contaminantes continuarem ocorrendo nestas áreas. Há, portanto, necessidade de fiscalizações que possibilitem a eliminação da fonte de contaminação para, então, ser possível e eficaz a utilização de técnicas de fitorremediação.

7. Referências bibliográficas

- Abbott, A., Abel, P.D., Arnold, D.W., Milne, A., 2000. Cost-benefit analysis of the use of TBT: The case for a treatment approach. *Sci. Total Environ.* 258, 5–19. doi:10.1016/S0048-9697(00)00505-2
- Abhilash, P.C., Jamil, S., Singh, N., 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.* 27, 474–488. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.002
- Adler, P.R., Harper, J.K., Takeda, F., Wade, E.M., Summerfelt, S.T., 2000. Economic evaluation of hydroponics and other treatment options for phosphorus removal in aquaculture effluent. *HortScience* 35, 993–999
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075
- Alkorta, I., Garbisu, C., 2001. *Phytoremediation of organic contaminants in soils* 79, 1994–1997.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings* 59, 2–20. doi:10.1016/j.porgcoat.2007.01.017
- Alonso, M.Á., Crespo, M.B., 2008. Taxonomic and nomenclatural notes on South American taxa of *Sarcocornia* (Chenopodiaceae). *Ann. Bot. Fenn.* 45, 241–254. doi:10.5735/085.045.0401
- Alzieu, C.L., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., Borel, M., 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* 17, 494–498. doi:10.1016/0025-326X(86)90636-3
- Alzieu, C., Sanjuan, J., Michel, P., Borel, M., Dreno, J.P., 1989. Monitoring and assesment of butyltins in Atlantic coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 22–26. doi:10.1016/0025-326X(89)90272-5
- Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T., 1993. Bioremediation in the Rhizosphere: Plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2630–2636. doi:10.1021/es00049a001
- Anderson, B.A., Unger, M.A., Moore, K.A., 2002. Fate of tributyltin in a created tidal wetland. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1176–1183. doi:10.1002/etc.5620210609
- Antizar-Ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to

- tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ. Int.* 34, 292–308. doi:10.1016/j.envint.2007.09.005
- Artifon, V., Castro, Í.B., Fillmann, G., 2016. Spatio temporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-016-6745-7
- Axiak, V.; Vella, A.J.; Micallef, D.; Chircop, P., 1995. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda : Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar. Biol.* 121, 685–691.
- Ayanda, O.S., Fatoki, O.S., Adekola, F.A., Ximba, B.J., 2012. Fate and Remediation of Organotin Compounds in Seawaters and Soils. *Chem. Sci. Trans.* 1, 470–481. doi:10.7598/cst2012.177
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C., 1999. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biochemical Resource for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. *Phytoremediation Contam. Soil Water* 85–107. doi:10.3923/jest.2011.118.138
- Balls, P.W., 1987. Tributyltin (TBT) in the waters of a Scottish sea loch arising from the use of antifoulant treated netting by salmon farms. *Aquaculture* 65, 227–237. doi:10.1016/0044-8486(87)90235-3
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 2003. Phytoremediation : principles and perspectives 2, 333–344.
- Batista-Andrade, J.A., Caldas, S.S., Batista, R.M., Castro, I.B., Fillmann, G., Primel, E.G., 2018. From TBT to booster biocides: Levels and impacts of antifouling along coastal areas of Panama. *Environ. Pollut.* 234, 243–252. doi:10.1016/j.envpol.2017.11.063
- Beaumont, A.R., Budd, M.D., 1984. High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Mar. Pollut. Bull.* 15, 402–405. doi:10.1016/0025-326X(84)90256-X
- Bernat, P., Szewczyk, R., Krupiński, M., Długoński, J., 2013. Butyltins degradation by *Cunninghamella elegans* and *Cochliobolus lunatus* co-culture. *J. Hazard. Mater.* 246–247, 277–282. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.12.034
- Bray, S., 2006. Tributyltin pollution on a global scale. An overview of relevant and recent research: impacts and issues. Contract 54.
- Brosillon, S., Bancon-Montigny, C., Mendret, J., 2014. Study of photocatalytic degradation of tributyltin, dibutyltin and monobutyltin in water and marine

- sediments. Chemosphere 109, 173–179.
doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.008
- Brosillon, S., Bancon-Montigny, C., Mendret, J., 2016. Photo-oxidation of Tributyltin, Dibutyltin and Monobutyltin in Water and Marine Sediments. Int. J. Chem. React. Eng. 14, 1–8. doi:10.1515/ijcre-2014-0127
- Brown, J.J., Glenn, E.P., Fitzsimmons, K.M., Smith, S.E., 1999. Halophytes for the treatment of saline aquaculture effluent. Aquaculture 175, 255–268. doi:10.1016/S0044-8486(99)00084-8
- Buosi, D., Felfili, J.M., 2004. Recuperação de áreas contaminadas por pesticidas organoclorados na Cidade dos Meninos, município de Duque de Caxias, RJ. Rev. Árvore 465–470. doi:10.1590/S0100-67622004000300018
- Cao, D., Jiang, G., Zhou, Q., Yang, R., 2009. Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk. J. Environ. Manage. 90, 16–24. doi:10.1016/j.jenvman.2008.06.007
- Carmo, M.L., Al., E., 2008. Plant Selection for Phytoremediation of Soils Contaminated with Picloram. Planta 301–313. doi:10.1590/S0100-83582008000200006
- Carvalho, P.N., Basto, M.C.P., Silva, M.F.G.M., Machado, A., Bordalo, A.A., Vasconcelos, M.T.S.D., 2010. Ability of salt marsh plants for TBT remediation in sediments. Environ. Sci. Pollut. Res. 17, 1279–1286. doi:10.1007/s11356-010-0307-1
- Carvalho, A.P.N. 2017. O uso da halófitas *Spartina alterniflora* para fitorremediação de Tributilestanho (TBT) em sedimentos costeiros. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Rio Grande/RS, 58p.
- Castro, Í.B., Perina, F.C., Fillmann, G., 2012a. Organotin contamination in South American coastal areas. Environ. Monit. Assess. 184, 1781–1799.
- Castro, Í.B., Rossato, M., Fillmann, G., 2012b. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. Environ. Toxicol. Chem. 31, 947–954.
- Castro, Í.B., Fillmann, G., 2012. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas. Environ. Toxicol. Chem. 31, 955–960.
- Castro, IB, Costa, PG, & Fillmann, G. 2015 Environmental matrices effect in butyltin

- determinations by GC/MS. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 10, n. 1, p. 47–53.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). 2012. Resolução n 454, de 1 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693>>. Acesso em: fev. 2017
- Costa, C.S.B., Bonilla, O.H., 2016. Halófitas brasileiras : formas de cultivo e usos .
- Costa, C.S.B., Bonilla, O.H., 2016. Halophytic life in Brazilian salt flats: Biodiversity, uses and threats. *Sabkha Ecosyst. V Am. V*, 19. doi:10.1007/978-3-319-27093-7
- Costa, C.S.B., Marangoni, J.C., Azevedo, A.M.G., 2003. Plant zonation in irregularly flooded salt marshes: Relative importance of stress tolerance and biological interactions. *J. Ecol.* 91, 951–965.
- Costa, C.S.B., Vicenti, J.R.M., Morón-Villarreyes, J.A., Caldas, S., Cardoso, L. V., Freitas, R.F., D'Oca, M.G.M., 2014. Extraction and characterization of lipids from *Sarcocornia ambigua* meal: A halophyte biomass produced with shrimp farm effluent irrigation. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86, 935–943.
- Coutinho, H.D., Barbosa, A.R., 2007. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. *Silva Lusit.* 15, 103–117.
- Cruz, A., Henriques, I., Sousa, A.C.A., Baptista, I., Almeida, A., Takahashi, S., Tanabe, S., Correia, A., Suzuki, S., Anselmo, A.M., Mendo, S., 2014. A microcosm approach to evaluate the degradation of tributyltin (TBT) by *Aeromonas molluscorum* Av27 in estuarine sediments. *Environ. Res.* 132, 430–437.
- Cruz, A., Anselmo, A.M., Suzuki, S., Mendo, S., 2015. Tributyltin (TBT): A review on microbial resistance and degradation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 970–1006.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715–719.
- Díez, S., Ábalos, 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. doi:10.1016/S0043-1354(01)00305-0

- Doncato, K.B., Costa, C.S.B., 2017. Growth and Mineral Composition of Two Lineages of the Sea Asparagus *Sarcocornia Ambigua* Irrigated With Shrimp Farm Saline Effluent. *Exp. Agric.* 1–18. doi:10.1017/S0014479717000096
- Dowson, P.H., Bubb, J.M., Lester, J.N., 1996. Persistence and Degradation Pathways of Tributyltin in Freshwater and Estuarine Sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42, 551–562. doi:http://dx.doi.org/10.1006/ecss.1996.0036
- Du, J., Chadalavada, S., Chen, Z., Naidu, R., 2014. Environmental remediation techniques of tributyltin contamination in soil and water: A review. *Chem. Eng. J.* 235, 141–150. doi:10.1016/j.cej.2013.09.044
- Dudimah, F.D., KatieOdman-Ghazi, S.O., Hatcher, F., Whalen, M.M., 2007. Effect of tributyltin (TBT) on ATP levels in human natural killer (NK) cells: Relationship to TBT-induced decreases in NK function. *J. Appl. Toxicol.* 27, 86–94. doi:10.1002/jat
- Eslamzadeh, T., 2006. *Salicornia europaea*, a Bioaccumulator in Maharlo Salt Lake Region.
- Francois, R., Short, F.T., Weber, J.H., 1989. Accumulation and persistence of tributyltin in eelgrass (*Zostera marina* L.) tissue. *Environ. Sci. Technol.* 23, 191–196. doi:10.1021/es00179a009
- Freitas, R.F., Costa, C.S.B., 2014. Germination responses to salt stress of two intertidal populations of the perennial glasswort *Sarcocornia ambigua*. *Aquat. Bot.* 117, 12–17. doi:10.1016/j.aquabot.2014.04.002
- Gadd, G.M., 2000. Microbial interactions with tributyltin compounds: Detoxification, accumulation, and environmental fate. *Sci. Total Environ.* 258, 119–127. doi:10.1016/S0048-9697(00)00512-X
- Ghaly, A.E., Kamal, M., Mahmoud, N.S., 2005. Phytoremediation of aquaculture wastewater for water recycling and production of fish feed. *Environ. Int.* 31, 1–13. doi:10.1016/j.envint.2004.05.011
- Gibbs, P., Bryan, G., 1987. TBT Paints and the Demise of the Dog-Whelk, *Nucella Lapillus* (Gastropoda). *Ocean.* '87 1482,1483,1484,1485,1486,1487. doi:10.1109/OCEANS.1987.1160635
- Godoi, A.F.L., Favoreto, R., Santiago-Silva, M., 2003. Contaminação ambiental por compostos organoestênicos. *Quim. Nova* 26, 708–716. doi:10.1590/S0100-40422003000500015
- Gomes, H.I., 2012. Phytoremediation for bioenergy: challenges and opportunities.

- Environ. Technol. Rev. 1, 59–66. doi:10.1080/09593330.2012.696715
- Gomes-Neto, A., Costa, C.S.B., 2009. Survival And Growth Of The Dominant Salt Marsh Grass *Spartina Alterniflora* In An Oil Industry Saline Wastewater. *Int. J. Phytoremediation* 11, 640–650. doi:10.1080/15226510902861727
- González-Alcaraz, M.N., Conesa, H.M., del Carmen Tercero, M., Schulin, R., Álvarez-Rogel, J., Egea, C., 2011. The combined use of liming and *Sarcocornia fruticosa* development for phytomanagement of salt marsh soils polluted by mine wastes. *J. Hazard. Mater.* 186, 805–813. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.071
- Graceli, J.B., Sena, G.C., Lopes, P.F.I., Zamprogno, G.C., da Costa, M.B., Godoi, A.F.L., dos Santos, D.M., de Marchi, M.R.R., dos Santos Fernandez, M.A., 2013. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. *Reprod. Toxicol.* 36, 40–52. doi:10.1016/j.reprotox.2012.11.008
- Grimón, R.O.R., Osorio, M.F.A., Freitas, D.M. de, Castro, Í.B., 2016. Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: Marine protected areas under threat. *Mar. Policy* 69, 24–31. doi:10.1016/j.marpol.2016.03.017
- Gudmundsdóttir, L.Ó., Ho, K.K.Y., Lam, J.C.W., Svavarsson, J., Leung, K.M.Y., 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.* 63, 500–507. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.02.012
- Hoch, M., 2001. Organotin compounds in the environment - An overview. *Appl. Geochemistry* 16, 719–743. doi:10.1016/S0883-2927(00)00067-6
- Hoch, M., Schwesig, D., 2004. Parameters controlling the partitioning of tributyltin (TBT) in aquatic systems. *Appl. Geochemistry* 19, 323–334. doi:10.1016/S0883-2927(03)00131-8
- Huang, J.H., Matzner, E., 2004. Adsorption and desorption of organotin compounds in organic and mineral soils. *Eur. J. Soil Sci.* 55, 693–698. doi:10.1111/j.1365-2389.2004.00634.x
- Idaszkin, Y.L., Lancelotti, J.L., Pollicelli, M.P., Marcovecchio, J.E., Bouza, P.J., 2017. Comparison of phytoremediation potential capacity of *Spartina densiflora* and *Sarcocornia perennis* for metal polluted soils. *Mar. Pollut. Bull.* 118, 297–306. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.03.007
- IMO, Summary of the status of conventions as at 31 May 2007, International Maritime Organization, United Kingdom, 2008.

- Isacch, J.P., Costa, C.S.B., Rodríguez-Gallego, L., Conde, D., Escapa, M., Gagliardini, D.A., Iribarne, O.O., 2006. Distribution of saltmarsh plant communities associated with environmental factors along a latitudinal gradient on the south-west Atlantic coast. *J. Biogeogr.* 33, 888–900. doi:10.1111/j.1365-2699.2006.01461.x
- ISO, 2002
- Joshi, A.J., Engenhardt, M., Wickern, M., Breckle, S.W., 1987. Seasonal Changes in the Trace Metals in Salt Marsh Angiosperms. *J. Plant Physiol.* 128, 173–177. doi:10.1016/S0176-1617(87)80192-X
- 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. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 19–23. doi:10.1007/s002449900074
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4106–4112. doi:10.1021/es030697z
- Lespes, G., Marcic, C., Le Hécho, I., 2003. Speciation of organotins in french beans and potatoes cultivated on soils spiked with solutions... *Electron. J. Environmental, Agric. Food Chemistry* 2, 365–373.
- Lespes, G., Marcic, C., Heroult, J., Le Hecho, I., Denaix, L., 2009. Tributyltin and triphenyltin uptake by lettuce. *J. Environ. Manage.* 90, 60–68. doi:10.1016/j.jenvman.2008.07.019
- Martins, M., Ferreira, A.M., Vale, C., 2008. The influence of *Sarcocornia fruticosa* on retention of PAHs in salt marsh sediments (Sado estuary, Portugal). *Chemosphere* 71, 1599–1606. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.054
- Mattos, Y., Stotz, W.B., Romero, M.S., Bravo, M., Fillmann, G., Castro, Í.B., 2017. Butyltin contamination in Northern Chilean coast: Is there a potential risk for consumers? *Sci. Total Environ.* 595, 209–217. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.264
- Moosavi, S.G., Seghatoleslami, M.J., 2013. Phytoremediation: A review. *Adv. Agric. Biol.* 1, 5–11.
- Negrin, V.L., Teixeira, B., Godinho, R.M., Mendes, R., Vale, C., 2017. Phytochelatins and monothiols in salt marsh plants and their relation with metal tolerance. *Mar. Pollut. Bull.* 121, 78–84. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.045

- Neto, A.G., Costa, C.S.B., 2009. Survival and growth of the dominant salt marsh grass *spartina alterniflora* in an oil industry saline wastewater. *Int. J. Phytoremediation* 11, 640–650. doi:10.1080/15226510902861727
- Novak, J., Trapp, S., 2005. Growth of plants on TBT-contaminated harbour sludge and effect on TBT removal. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 12, 332–41. doi:10.1065/espr2005.08.282
- Okoro, H.K., Fatoki, O.S., Adekola, F.A., Ximba, B.J., Snyman, R.G., Opeolu, B., 2011. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213. *Toxicology* 213, 27–54. doi:10.1007/978-1-4419-9860-6
- Omae, I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl. Organomet. Chem.* 17, 81–105. doi:10.1002/aoc.396
- Otte, M.L., Bestebroer, S.J., van der Linden, J.M., Rozema, J., Broekman, R. a, 1991. A survey of zinc, copper and cadmium concentrations in salt marsh plants along the Dutch coast. *Environ. Pollut.* 72, 175–89.
- Ozawa, T., Miura, M., Fukuda, M., Kakuta, S., 2010. Cadmium tolerance and accumulation in a halophyte *Salicornia europaea* as a new candidate for phytoremediation of saline soils. *Sci. Rep. Grad. Sch. Life Environ. Sci.* 60, 1–8.
- 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. doi:10.1007/s10661-008-0439-7
- Pires, F.R., Souza, C.M., Silva, A.A., Queiroz, M.E.L.R., Procópio, S.O., Santos, J.B., Santos, E.A., Cecon, P.R., 2003. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de tebuthiuron. *Planta Daninha* 21, 451–458. doi:10.1590/s0100-83582003000300014
- Pradhan, S.P., Conrad, J.R., Paterek, J.R., Srivastava, V.J., 1998. Potential of Phytoremediation for Treatment of PAHs in Soil at MGP Sites. *J. Soil Contam.* 7, 467–480. doi:10.1080/10588339891334401
- Reboreda, R., Caçador, I., 2007. Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environ. Pollut.* 146, 147–154. doi:10.1016/j.envpol.2006.05.035
- Redondo-Gómez, S., Andrades-Moreno, L., Parra, R., Valera-Burgos, J., Real, M., Mateos-Naranjo, E., Cox, L., Cornejo, J., 2011. *Spartina densiflora* demonstrates high tolerance to phenanthrene in soil and reduces its concentration. *Mar. Pollut.*

- Bull. 62, 1800–1808. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.018
- Reichenauer, T.G., Germida, J.J., 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem* 1, 708–717. doi:10.1002/cssc.200800125
- Rozema, J., Schat, H., 2013. Salt tolerance of halophytes , research questions reviewed in the perspective of saline agriculture & . *Environ. Exp. Bot.* 92, 83–95. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.08.004
- Sakultantimetha, A., Keenan, H.E., Beattie, T.K., Aspray, T.J., Bangkedphol, S., Songsasen, A., 2010. Acceleration of tributyltin biodegradation by sediment microorganisms under optimized environmental conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 467–473. doi:10.1016/j.ibiod.2010.05.007
- Sant’Anna, B.S., Santos, D.M., Marchi, M.R.R., Zara, F.J., Turra, A., 2014. Surface-sediment and hermit-crab contamination by butyltins in southeastern Atlantic estuaries after ban of TBT-based antifouling paints. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6516–6524. doi:10.1007/s11356-014-2521-8
- Santos, D.M., Sant’Anna, B.S., Godoi, a., Turra, a., Marchi, M., 2011. Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. *Nov. Sci. Publ.* 31–59.
- Santos, D.M. dos, Turra, A., de Marchi, M.R.R., Montone, R.C., 2016. Distribution of butyltin compounds in Brazil’s southern and southeastern estuarine ecosystems: assessment of spatial scale and compartments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 16152–16163. doi:10.1007/s11356-016-6720-3
- Schnoor, J.L., Licht, L. a., McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H., 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29, 318–323. doi:10.1021/es00007a747
- Silva, P. V., Silva, A.R.R., Mendo, S., Loureiro, S., 2014. Toxicity of tributyltin (TBT) to terrestrial organisms and its species sensitivity distribution. *Sci. Total Environ.* 466–467, 1037–1046. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.002
- Smillie, C., 2015. *Salicornia* spp. as a biomonitor of Cu and Zn in salt marsh sediments. *Ecol. Indic.* 56, 70–78. doi:10.1016/j.ecolind.2015.03.010
- Smith, B.S., 1981. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *J. Appl. Toxicol.* 1, 141–144. doi:10.1002/jat.2550010302
- Sousa, A.C.A., Pastorinho, M.R., Takahashi, S., Tanabe, S., 2014. History on organotin compounds, from snails to humans. *Environ. Chem. Lett.* 12, 117–137.

doi:10.1007/s10311-013-0449-8

- Stäb, J.A., Traas, T.P., Stroomborg, G., Van Kesteren, J., Leonards, P., Van Hattum, B., Brinkman, U.A.T., Cofino, W.P., 1996. Determination of organotin compounds in the foodweb of a shallow freshwater lake in the Netherlands. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 319–328. doi:10.1007/s002449900115
- Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* 18, 647–658. doi:10.1016/S0925-8574(02)00026-5
- Takahashi, S., Mukai, H., Tanabe, S., Sakayama, K., Miyazaki, T., Masuno, H., 1999. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environ. Pollut.* 106, 213–218. doi:10.1016/S0269-7491(99)00068-8
- Tanabe, S., 1999. Butyltin contamination in marine mammals - A review. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 62–72. doi:10.1016/S0025-326X(99)00064-8
- Unger, M.A., MacIntyre, W.G., Huggett, R.J., 1988. Sorption behavior of tributyltin on estuarine and freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 907–915. doi:10.1002/etc.5620071107
- USEPA. 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. Washington, U.S. Environmental Protection Agency.
- WHO (1990) Environmental health criteria for tributyltin compounds. In: Environmental health criteria, vol 116. World Health Organization, Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc116.htm>
- Williams, T.P., Bubbs, J.M., Lester, J.N., 1994. Metal accumulation within salt marsh environments: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 277–290. doi:10.1016/0025-326X(94)90152-X
- Wiltse, C.C., Rooney, W.L., Chen, Z., Schwab, a. P., Banks, M.K., 1998. Greenhouse Evaluation of Agronomic and Crude Oil-Phytoremediation Potential among Alfalfa Genotypes. *J. Environ. Qual.* 27, 169. doi:10.2134/jeq1998.00472425002700010024x
- Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coatings* 50, 75–104. doi:10.1016/j.porgcoat.2003.06.001
- Zar, J. H.. (2010) *Bioestatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 944p.
- Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2013. Removal of pharmaceuticals

and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environ. Pollut.* 184, 20. doi:10.1016/j.envpol.2013.09.009