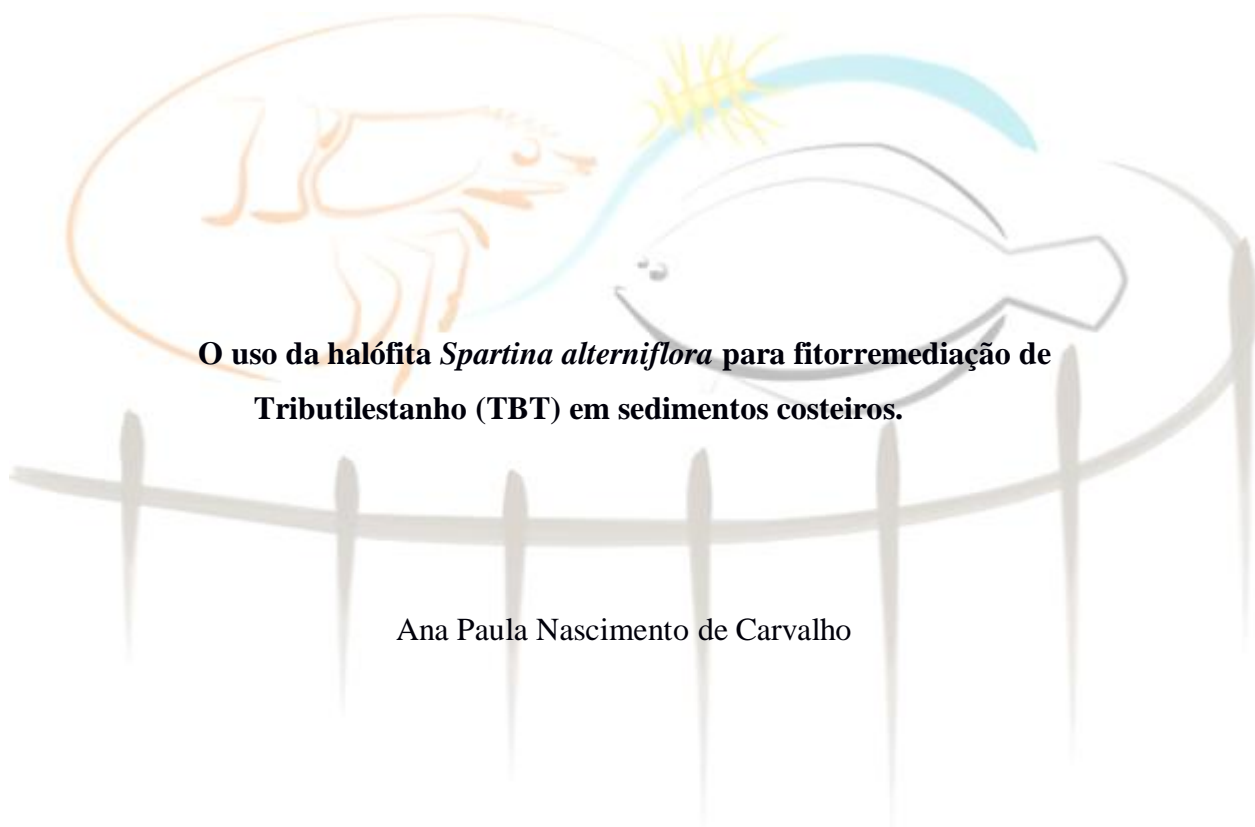




FURG

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



**O uso da halófito *Spartina alterniflora* para fitorremediação de
Tributilestanho (TBT) em sedimentos costeiros.**

Ana Paula Nascimento de Carvalho

Rio Grande

2017

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

**O uso da halófito *Spartina alterniflora* para fitorremediação de
Tributilestanho (TBT) em sedimentos costeiros**

Ana Paula Nascimento de Carvalho

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
2017

Sumário

| | |
|---|------|
| Lista de abreviatura | III |
| Lista de Tabelas | IV |
| Lista de Figuras..... | V |
| AGRADECIMENTOS..... | VII |
| Resumo | VIII |
| ABSTRACT | X |
| 1.Introdução | 1 |
| 1.1 Compostos organoestânicos | 2 |
| 1.1.1 TBT na zona costeira | 4 |
| 1.2 Capacidade fitorremediadoras do TBT das plantas aquáticas..... | 5 |
| 1.2.1 Capacidade de fitorremediação por <i>Spartina</i> spp. | 5 |
| 2. Objetivo | 7 |
| 2.1. Objetivo Geral | 7 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 7 |
| 3. Materiais e Métodos | 8 |
| 3.1. Preparo das mudas | 8 |
| 3.2. Características do solo de cultivo e fortificação com TBT | 8 |
| 3.3. Montagem dos tratamentos experimentais..... | 11 |
| 3.4. Avaliação da Biomassa | 13 |
| 3.5. Análises químicas | 13 |
| 3.6. Análises dos dados | 16 |
| 3.6.1. Efeitos do TBT no crescimento da <i>S. alterniflora</i> | 16 |
| 3.6.2 Efeitos remediadores da presença de plantas de <i>S. alterniflora</i> em solos contaminados com TBT. | 16 |
| 4. Resultados..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 4.1 Efeitos do TBT no crescimento da <i>S. alterniflora</i> | 18 |
| 4.2. Efeitos remediadores da presença de plantas de <i>S. alterniflora</i> em solos contaminados com TBT | 24 |
| 5. Discussão..... | 31 |
| 5.1 Efeitos do TBT no crescimento da <i>S. alterniflora</i> | 31 |
| 5.2 Efeitos remediadores da presença de plantas de <i>S. alterniflora</i> em solos contaminados com TBT | 34 |
| 6. Conclusão | 36 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 37 |
| ANEXO I | 43 |

Lista de abreviatura

| | |
|--------|---|
| %C | Percentagem de Carbono |
| ANOVA | Análise de Variância |
| BFS | Biomassa de Folhas Secas |
| BRS | Biomassa de Raízes Secas |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| COT | Carbono Orgânico Total |
| DBT | Dibutilestanho |
| EC50 | Metade da concentração máxima efetiva (“Half maximal efetive concentration”) |
| ES | Espirito Santos |
| Fig. | Figura |
| HCl | Ácido clorídrico |
| IMO | Organização Marítima Internacional |
| LOEC | Valores de menor concentração com efeito observável (“Lowest Observed Effects”) |
| MBT | Monobutilestanho |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| Ots | Organoestânicos totais |
| P | Fósforo |
| Tab. | Tabela |
| Tab. S | Tabela Sulementar |
| TBT | Tributilestanho |
| TM | Taxa de Mortalidade |
| TN | Taxa de Natalidade |
| USEPA | United States Envirometal Protection Agency |

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Valores médios globais (mínimos - máximos) da umidade, condutividade e teor de carbono (%C) dos solos nos vasos dos diferentes tratamentos de TBT observados durante o experimento. n=10, exceto para teor de carbono onde n=6. Dados de vasos sem e com plantas foram reunidos11
- Tabela 2: Parâmetros Instrumentais.....13
- Tabela 3: Compostos, tempos de retenção, íons de monitoramento (íons de quantificação (Q) e íons de confirmação (C1 e C2)).....13
- Tabela 4: Médias (\pm erro padrão; n=5) das taxas de natalidade (TN) e mortalidade (TM) foliar, perfilhamento e expansão foliar das hastes mãe de *Spartina alterniflora*, calculadas entre os intervalos de 0 a 60 dias (A) e 60 a 90 dias (B) de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Resultados das Análises de Variância de todos os parâmetros entre concentrações de TBT e estimativas de renovação foliar das plantas nos períodos de cultivo são apresentados. Apenas hastes mãe apresentaram mortalidade foliar.21
- Tabela 5: Médias (\pm erro padrão; n=5) da percentagem de biomassa foliar das plantas de *Spartina alterniflora* cultivadas em diferentes concentrações de TBT aos 60 e 90 dias do experimento.24
- Tabela 6: Média e coeficiente de variação (CV) das concentrações dos butilestânicos de cada nível de fortificação de uma amostra de um frasco com solo fortificado.....25
- Tabela 7: Médias (\pm erros padrões; n=3) concentração dos organoestânicos nos solos fortificados com dois níveis de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*, coletados aos 0, 60 e 90 dias do experimento e do total de organoestânicos (OTs). Para cada organoestânico e OTs letras maiúsculas diferentes ao longo das linhas indicam médias significativamente ($p < 0,05$) diferentes entre tempos de cultivo, conforme o teste LSD. Letras minúsculas diferentes indicam médias significativamente ($p < 0,05$) diferentes entre níveis dos tratamentos tempo de cultivo e presença de plantas somente nos tempos 60 e 90 dias.28

Lista de Figuras

- Figura 1: Cultivo de mudas de *Spartina alterniflora* em bandejas plásticas.8
- Figura 2: Mesa de rolamento, onde foi realizada a homogeneização da solução de fortificação no solo.10
- Figura 3: Cultivo de *Spartina alterniflora* em estufa (a); detalhamento da *Spartina alterniflora* em vaso devidamente preparado para o cultivo em solo contaminado com TBT (b).12
- Figura 4: Médias (\pm erros padrões; $n=5$) das alturas (a), número de folhas vivas (b) e de folhas mortas (c) das hastes mãe de *Spartina alterniflora* ao longo dos 90 dias de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.19
- Figura 5: Médias (\pm erros padrões; $n=5$) do número de perfilhos formados das hastes mãe de *Spartina alterniflora* (a), do somatório do comprimento de todas as folhas dos perfilhos (b) e do número de folhas vivas dos perfilhos (c) ao longo dos 90 dias de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.20
- Figura 6: Médias (\pm erros padrões; $n=5$) das (A) biomassas de folhas secas (BFS) e de (B) raízes (BRS) das plantas de *Spartina alterniflora* ao longo dos 90 dias de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.23
- Figura 7: Cromatograma do TBT (A), DBT (B) e MBT (C), da solução estoque preparada para uso na fortificação do solo.24

Figura 8: Interação tempo de cultivo 60 (2) e 90 (3) dias e a presença da planta (linha azul) e sem a presença (linha vermelha) da planta no solo.26

Figura 9: Taxa média de degradação do TBT (n=3) nos solos fortificados com dois níveis de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*, em dois períodos do experimento (0 a 60 dias; e 0 a 90 dias).
29

Figura 10: Percentual (%) de organoestânicos em 0, 60 e 90 dias de cultivo em solos contaminados com nível baixo e alto de contaminação por TBT nos vasos com e sem a presença de *S. alterniflora*. A baixo dos gráficos em pizza estão indicador o total de organoestânicos em Sn.g⁻¹ de cada tratamento em cada tempo de cultivo.30

AGRADECIMENTOS

Nossa já chegou essa hora. A realização desse trabalho, a finalização de mais essa etapa profissional e todo crescimento adquirido como pesquisadora e pessoa só foram possíveis, pois o Cara Lá de Cima assim me permitiu, acima de tudo agradeço a Ele.

Tânia, Sérgio e Caio que nunca me deixaram fraquejar e a todos da família, eles que me acompanharam e torceram por mim e mesmo de tão longe, me deram todo apoio que precisei.

Meu professor e orientador César Costa que me deu todo apoio em todas as etapas desse trabalho, que sempre se mostrou disponível quando precisei, obrigado pela paciência e por compartilhar seu conhecimento. Ao meu co-orientador Gilberto Fillmann agradeço a disponibilidade e conhecimento compartilhado. Vocês foram e serão inspirações profissionais para mim, me fizeram ver que sou capaz de ir sempre um pouco mais além.

Todos os professores da Pós-graduação em Aquicultura pelas aulas esclarecedoras e ricas em conhecimento

A família que essa jornada me deu, não tem como não nos sentirmos uma família, Camila, Gabriel, Mariah, Mone, foi lindo esses dois anos compartilhados.

Aos amigos de laboratório pelas incríveis trocas de experiência que nunca serão tiradas: Glauce, Manuel, Kennia, Fiamma, Ju, Rodrigo, Vanda, Juliê, César, Leonardo, Sany, Ozelito, Nilson, Márcio, Mariana, Vanessa.

Aos amigos que fiz no Cassino, como digo esse lugar é um universo paralelo, tudo aqui é mais intenso, todos que aqui conheci foram especiais de alguma forma, contribuíram de alguma maneira em meu crescimento pessoal e profissional.

Aos responsáveis pelos laboratórios que me possibilitaram a conclusão desse trabalho, ECOVECO, BTH, CONECO e o Laboratório da Hidroquímica.

A todos da Estação Marinha de Aquicultura, a troca de experiência foi incrível.

Aos funcionários dos prédios que frequentei, todos sempre dispostos a ajudar.

A CAPES, órgão de fomento da bolsa de mestrado concedia, sem ela não seria possível minha estadia em Rio Grande nesses dois anos.

A FINEP pelo financiamento do Projeto AIBRASIL II - Micropoluentes orgânicos empregados em sistemas anti-incrustantes: comportamento ambiental, toxicidade e biorremediação.

Resumo

Plantas superiores aquáticas expostas a solos costeiros contaminados por compostos inorgânicos e orgânicos, como a grama rizomatosa de zonas entremarés *Spartina alterniflora* Loisel., têm mostrado potencial de serem utilizadas como fitorremediadoras. O tributilestanho (TBT) é considerado um dos organoestânicos mais tóxicos liberados no ambiente, capaz de provocar alterações no desenvolvimento de bivalves e o efeito imposex em gastrópodes (masculinização de fêmeas), assim como pode afetar o sistema imune humano. Desde a década de 1960 foi empregado em escala global como biocida ativo em tintas anti-incrustantes, sendo esta prática proibida pela Organização Marítima Internacional em 2008. Uma ampla variação de concentrações do TBT e outros butilestânios, resultantes de sua degradação (DBT e MBT) são detectados em solos estuarinos próximos aos principais portos brasileiros, indicando sua utilização clandestina, comercialização e uma elevada persistência ambiental. O presente estudo investigou, através de um cultivo em condições controladas de laboratório, a tolerância e a capacidade de fitorremediar solos contaminados por tributilestanho (TBT) da grama *S. alterniflora*. Mudanças de *S. alterniflora* foram cultivadas em vasos com 450g de sedimento fortificados com concentrações médias iniciais de 0 (controle), 179,04 ngTBT.g⁻¹ (nível baixo) e 834,72 ngTBT.g⁻¹ (nível alto) por 90 dias. Nos dias 0, 60 e 90 do experimento, o desenvolvimento das plantas foi quantificado e as concentrações dos butilestânios medidas no solo dos vasos com plantas, como em vasos adicionais sem plantas. *S. alterniflora* mostrou uma alta tolerância à contaminação sedimentar por TBT. Nenhuma planta morreu durante o experimento. Hastes inicialmente plantadas (“plantas mãe”) e os vários perfilhos formados cresceram vigorosamente (médias de altura de 40-70 cm e 3-6 folhas vivas por haste) no solo controle e contaminados com TBT. Plantas mãe em solos contaminados com TBT apresentaram uma pequena redução da renovação foliar (possível menor atividade metabólica) nos primeiros 60 dias. A biomassa foliar nos vasos em todos os níveis de TBT dobrou nos últimos 30 dias, mas plantas no nível baixo de TBT apresentaram biomassa de raízes significativamente ($p < 0,05$) maiores e menores alocações em biomassa foliar do que os demais níveis de TBT. A presença de *S. alterniflora* resultou em uma degradação 196% maior dos butilestânicos totais no nível alto de contaminação de TBT do que em vasos controle não vegetados após 90 dias de crescimento. As reduções observadas em vasos com e sem plantas foram, respectivamente, de 72,05% e 25,35%. A rápida metabolização do

TBT nos solos contaminados e o aumento das frações de DBT e MBT no bioensaio nos primeiros 60 dias sugerem um importante papel de microorganismos na degradação do TBT. A marcada redução dos níveis de DBT, MBT e butilestânicos totais nos últimos 30 dias de cultivo em solos vegetados e com alto nível de TBT sugerem um aumento da capacidade de fitorremediação devido ao crescimento das plantas. Dentro das condições experimentais da *S. alterniflora* foi capaz de remediar solos contaminados por altos teores de TBT.

Palavras chave: tributilestanho; microcontaminantes; fitodegração; macrófita aquática.

ABSTRACT

Higher aquatic plants exposed to coastal soils contaminated with inorganic and organic compounds, such as the rhizomatous grass of intertidal zones *Spartina alterniflora* Loisel., have shown potential to be used as phytoremediation agents. Tributyltin (TBT) is considered to be one of the most toxic organotins released into the environment, capable of causing changes in bivalve development and the imposex effect on gastropods (masculinisation of females), as well as affecting the human immune system. Since the 1960s it has been used on a global scale as an active biocide in antifouling paints, and this practice was banned by the International Maritime Organization in 2008. A wide range of TBT concentrations and other butyltins, its degradation products, are detected in estuarine soils close to the main Brazilian ports, indicating its clandestine use, commercialization and a high environmental persistence. The present study investigated the tolerance and phytoremediation of tributyltin contaminated soils (TBT) of the grass *S. alterniflora*, under laboratory controlled conditions. *S. alterniflora* sprouts were cultivated in pots with 450g of fortified soil with initial average concentrations of 0 (control), 179.04 ngTBT.g⁻¹ (low level) and 834.72 ngTBT.g⁻¹ (high level) per 90 days. On days 0, 60 and 90 of the experiment, the development of the plants was quantified and the concentrations of the butyltins measured in the soil of the pots with plants, as in additional pots without plants. *S. alterniflora* showed a high tolerance to sediment contamination by TBT. No plant died during the experiment. Initially planted tillers ("mother plants") and sprouted tillers formed vigorously (mean height 40-70 cm and 3-6 live leaves per tiller) in the control soil and soils contaminated with TBT. Mother plants in TBT-contaminated soils showed a small reduction in leaf turnover (possible lower metabolic activity) in the first 60 days. At all TBT levels, leaf biomass in the pots doubled in the last 30 days, but plants at low TBT level had significantly higher ($p < 0.05$) root biomass and lower leaf biomass allocations than the other TBT levels. After 90 days of growth, the presence of *S. alterniflora* resulted in a 196% higher degradation of total butyltins at the high level of TBT contamination than in non-vegetated control pots. The reductions observed in pots with and without plants were 72.05% and 25.35%, respectively. The rapid metabolism of TBT in contaminated soils and the increase of DBT and MBT fractions during the first 60 days of the bioassay suggest an important role of microorganisms in the degradation of TBT. In the

last 30 days of cultivation, the marked reduction of DBT, MBT and total butyltins in vegetated pots with high TBT level suggests an increase in phytoremediation capacity due to plant growth. Within the experimental conditions used, *S. alterniflora* was able to remediate soils contaminated by high levels of TBT.

Keywords: Tributyltin; microcontaminants; phytodegradation; aquatic macrophyte.

1. Introdução

A aquicultura é a produção de organismos que possuem uma parte ou todo seu ciclo de vida na água, como peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis e plantas aquáticas para o uso do homem. Plantas aquáticas podem ser cultivadas para atender diferentes finalidades, tanto de interesse puramente ambiental como econômico. Seu cultivo não se limita para produção de alimentos e outros bioprodutos, mas também para a fitorremediação de solos contaminados, a depuração de efluentes da aquicultura (e.g., biofiltros/bioreatores) ou a criação/restauração de ambientes aquáticos vegetados (Azevedo et al., 2016; Costa & Herrera, 2016; FAO 2014;).

A fitorremediação consiste em uma técnica de remediação ambiental que utiliza a atividade biológica das plantas para remover contaminantes do meio ou reduzi-los à formas químicas de menor toxicidade ambiental (Gratão et al., 2005; Almeida et al., 2015). As plantas são capazes de promover processos de adsorção, absorção, acumulação, degradação, volatilização de compostos orgânicos e inorgânicos, a ação enzimática desempenha importante papel nesses processos (Almeida et al., 2015; Meggo & Schnoor, 2013). A alteração das condições físico-químicas do solo próximo das raízes das plantas, como mudanças de pH, do potencial de oxiredução e do teor de matéria orgânica, pode também degradar contaminantes ou favorecer o crescimento de microorganismos que irão degradar estes compostos (Gratão et al., 2005).

Para que a fitorremediação possa ser aplicada para diferentes compostos contaminantes se faz necessário o melhor entendimento da viabilidade de crescimento e o potencial da espécie vegetal a ser utilizada para o propósito de eliminação do contaminante do meio (Lytle & Lytle, 2001; Neto & Costa, 2009; Novak & Trapp, 2005). Por exemplo, para fitorremediação de solos salinos é necessária a identificação de plantas que cresçam vigorosamente na presença de sal e tolerem os contaminantes. Plantas aquáticas costeiras tolerantes a salinidade (halófitas) têm sido utilizadas como bioindicadoras e para fitorremediação de contaminantes ambientais tanto inorgânicos como orgânicos (Almeida et al., 2009; Lin et al., 2016; Redondo-Gómez et al., 2011).

Ao longo da costa brasileira, gramas do gênero *Spartina* (Poaceae) crescem em marismas e bordas de manguezais (Costa et al., 2009; Costa & Davy, 1992). Essas gramas demonstram tolerância e a capacidade de acumulação de metais pesados (Lacerda, 1997) e de contaminantes orgânicos originados do petróleo (Lin et al., 2016; Neto & Costa, 2009; Viana et al., 2008). Logo, a elevada resiliência das espécies deste

gênero sugerem um grande potencial de sua utilização no controle da contaminação por compostos inorgânicos e orgânicos no ambiente costeiro.

O tributilestanho (TBT) é um composto organoestânico tóxico, que quando presente no ambiente marinho é capaz de provocar efeitos deletérios sobre o ambiente marinho, mesmo em concentrações muito baixas (Castro et al., 2007). Esse composto é utilizado na fabricação de tintas anti-incrustantes, com a finalidade de evitar a bioincrustação (Castro et al., 2012; Quintas et al., 2016). Concentrações elevadas de TBT foram registradas em sedimentos estuarinos próximos aos principais portos brasileiros (Castro et al., 2012; Santos et al., 2016; Santos et al., 2011). Estas regiões portuárias possuem grande importância econômica e localizam-se em ambientes estuarinos, que além de alta diversidade de fauna e flora marinha são áreas de intensa atividade pesqueira e de projetos de aquicultura, cujos organismos capturados/produzidos poderiam transferir o TBT para populações humanas.

1.1 Compostos organoestânicos

Os compostos organoestânicos possuem uma estrutura composta por um átomo de estanho covalente ligado a um ou mais cadeia carbônica (metil, etil, propil, butil, fenil) (Hoch, 2001). O número de ligações Sn-C e o comprimento da cadeia do grupo carbônico influenciam nas propriedades físico-químicas desses compostos. Estes compostos são hidrofóbicos, característica que irá depender da ligação do grupo alquil/arilo ao átomo de estanho. Temperatura, força iônica e pH irão influenciar sobre a solubilidade dos organoestânicos (Hoch, 2001; Santos et al., 2011).

No ambiente o tributilestanho é um organoestânico que possui sua toxicidade relacionada a sua concentração, tempo de exposição e biodisponibilidade, possui alto coeficiente de partição ($\text{Log } K_{ow}$), que é um parâmetro que caracteriza a bioacumulação do composto, seu nível de toxicidade decai à medida que se degrada sendo o dibutilestanho (DBT), monobutilestanho (MBT) seus produtos de degradação e o estanho inorgânico (Sn^{4+}) seu produto final de risco tóxico nulo (Rudel, 2003).

Compostos organoestânicos foram largamente utilizados na composição de fungicidas, acaricidas e inseticidas atualmente seu uso para fins agrícola não é mais recomendado, entretanto estudos recentes apontam como fonte o uso de TBT como pesticidas na agropecuária (Novak & Trapp, 2005; Silva et al., 2014).

O TBT foi empregado em escala global como principal biocida ativo em tintas anti-incrustantes desde a década de 1960 e devido à sua grande eficiência essas foram maciçamente utilizadas até 1990 (Castro et al., 2012; Godoi et al., 2003) sendo essa apontada como a principal via do composto para o meio ambiente (Du et al., 2014; Godoi et al., 2003). O TBT pode também ser proveniente de outras fontes como conservantes de madeira, torres de resfriamento de águas industriais, artes de pesca, gaiolas de maricultura, e da indústria têxtil (Peachey, 2003).

A aplicação de tintas com TBT sobre as superfícies expostas diretamente a água do mar como cascos de embarcações, estruturas *offshore*, redes de aquicultura e ductos possuem vantagens econômicas, como redução do consumo de combustível pelas embarcações decorrente da eliminação de bioincrustações e consequente diminuição do atrito entre a água e o casco das mesmas. Seu uso aumenta o intervalo de manutenção das estruturas sobre as quais são aplicadas a tinta anti-incrustante, evitando também corrosão das mesmas e diminuindo a introdução de espécies não nativas nos ambientes (Castro et al.; Quintas et al., 2016).

O TBT é capaz de provocar efeitos nocivos em diferentes concentrações. Devido a sua lipofilicidade elevada este composto penetra nos tecidos dos organismos, provocando com concentrações menores que 1 ng.L^{-1} , o efeito *impossex* em gastrópodos, que consiste na alteração morfológica das estruturas sexuais em fêmeas através de alterações endócrinas, como também efeitos negativos sobre o desenvolvimento do fito- e zooplâncton, alterações no desenvolvimento de bivalves e na reprodução de peixes, além de imunossupressão em mamíferos (Alzieu, 2000; Antizar-Ladislao, 2008; Castro et al., 2012). Estudos também relatam implicação sobre o sistema imune humano, como a indução a deficiência imunológica, cardíaca e neurológica (Antizar-Ladislao, 2008; Peachey, 2003; Simon et al., 2002).

O primeiro registro de dano provocado por tintas anti-incrustantes a base de TBT, ocorreu na França, em cultivo de ostra *Crassostrea gigas*, ao final dos anos 70, na baía de Arcachon (Alzieu et al. 1986). A revisão realizada por Castro et al. (2012) a respeito dos impactos ambientais dos organoestânicos na América do sul aponta efeitos, no cultivo de *Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Perna viridis* e do gastrópode *Chorus giganteus*.

Diante dos primeiros efeitos ambientais observados pela presença do TBT no ambiente marinho, a primeira restrição do uso de TBT na composição de tintas anti-incrustantes ocorreu na França em 1982 que proibiu o uso para navios com menos de 25

m de comprimento, em 1987 a proibição ocorreu no Reino Unido, similarmente, em 1988 foi introduzida a legislação nos Estados Unidos, em 1989 nos países como Canadá, Austrália e Nova Zelândia. Em 1990 o Japão restringiu o uso de TBT em revestimentos anti-crustantes embarcações e redes de aquicultura, em 1992 o uso foi banido em todas as embarcações.

Em 1990 a Organização Marítima Internacional (IMO) propôs a eliminação do uso de tintas à base de TBT, a resolução é aprovada apenas em 1999, levando a uma proibição legal do uso em qualquer embarcação a partir de 2003, apenas em 2008 o uso foi definitivamente proibido em qualquer navio ou estrutura (Du et al. 2014; Castro et al. 2007; Walmsley 2002). O Brasil é um dos países signatários da IMO e seguiu as normas estabelecidas, proibindo a utilização de TBT, atualmente os limites de concentrações seguem o descrito na resolução CONAMA 454/2012.

1.1.1 TBT na zona costeira

Com o banimento do uso de TBT por consequências suas concentrações no ambiente e seus efeitos sobre a biota marinha começaram a ser reduzidos, além da recuperação de algumas áreas costeiras. Entretanto os países não signatários da IMO, não possui regulamentação para o uso, além da falta de fiscalização existente. Santos et al., 2016 na discussão de seu trabalho relatam que concentrações dos bultiestânicos continuam sendo detectadas em sedimentos de diversos países como Equador, Portugal, China Índia e Indonésia, Paz-Villarraga et al. (2015) registrou na Venezuela a maior concentração de $5,3 \times 10^3 \text{ ngTBT.g}^{-1}$. Os estudos indicam a utilização clandestina, a livre comercialização e a elevada persistência fazendo do TBT um problema ainda para ser superado. Muitos estudos investigam a contaminação de ambientes portuários por organoestânicos, através do uso do efeito *impossex* como bioindicador e determinação das concentrações na matriz sedimentar, níveis de TBT juntamente com os produtos da sua degradação, DBT e MBT foram detectados, sobretudo na América do Sul (Castro et al., 2012; Sant'anna et al., 2014; Paz-Villarraga et al., 2015; Lahbib et al., 2009). Os trabalhos citados acima apontam o TBT como um dos poucos microcontaminantes em níveis ambientais com comprovada toxicidade nos organismos.

Foram detectadas concentrações de butilestanhos em sedimentos estuarinos próximos aos principais portos brasileiros, destacando uma ampla variação com valores locais de TBT. Foram encontrados mínimos de < 15 a 44 ng TBT g^{-1} na Baía de Todos

os Santos, estudo de Santos et al. (2016) detectou a maior concentração em sedimento superficial de suas áreas amostras de 279 ng TBT.g⁻¹, em amostragem realizada entre junho e julho de 2010. Amostragem realizada entre os anos de 2008 e 2010 foi registrado um nível de aproximadamente 888 ngTBT.g⁻¹ em estuários de Vitória-ES (Sant'anna et al., 2014).

1.2 Capacidade fitorremediadoras do TBT das plantas aquáticas

As plantas podem ser utilizadas como ferramentas de fundamental relevância para investigação da contaminação de compostos inorgânicos ou orgânicos presentes no solo, como também podem ser utilizadas como remediadoras ambientais. Bioensaios se mostraram eficazes na verificação de efeitos toxicológicos da exposição de espécies de plantas a compostos químicos (Redondo-Gómez et al., 2011; Silva et al., 2014)

Francois et al. (1989) avaliaram a absorção do TBT em ambiente aquático pela fanerógama submersa marinha *Zostera marina* L., concluindo que esta planta absorvia e acumulava rapidamente o TBT em seu tecido, podendo ser utilizada como organismo biomonitor deste composto. Estes autores também observaram que *Z. marina* era capaz de degradar o TBT absorvido no seu tecido em dibutilestanho (DBT) e posteriormente em monobutilestanho (MBT), que eram liberados lentamente para o meio externo.

Carvalho et al. (2010) demonstraram uma elevada capacidade acumuladora de TBT a partir de solos contaminados por plantas aquáticas vasculares de zonas entremarés. Esse estudo realizado no sul de Portugal sugeriu a utilização das plantas enraizadas halófitas estudadas (*Spartina maritima*, *Sarcocornia fruticosa* e *Halimione portulacoides*) como elementos biorremediadores de áreas costeiras contaminadas por TBT. Por exemplo, após nove meses de crescimento de *H. portulacoides*, os solos próximos às raízes desta planta possuíam 30% menos TBT do que solos adjacentes sem cobertura vegetal.

1.2.1 Capacidade de fitorremediação por *Spartina* spp.

Gramas halófitas emergentes dominantes de zonas entremarés do gênero *Spartina* têm demonstrado potencial para utilização como biomonitoras e fitorremediadoras de solos costeiros. Entre as espécies mais estudadas do gênero se destaca a *Spartina alterniflora*, encontrada ao longo da costa Atlântica das Américas onde domina a zona baixa do entremarés, frequentemente alagada por água salgada e

crescendo no sedimento anóxico (Costa & Davy, 1992; Costa et al., 2009). Devido a capacidade de acumular compostos orgânicos e inorgânicos, o plantio de *S. alterniflora* tem sido recomendado para o tratamento de solos e efluentes salinos contaminados com hidrocarbonetos oriundos da indústria do petróleo (Viana et al., 2008; Gomes Neto & Costa, 2009) e de efluentes salinos da carcinocultura marinha ricos em macronutrientes (Sousa, 2003; Canary, 2007; Sousa et al., 2011). Adicionalmente, *S. alterniflora* é uma espécie bioengenhreira que pode ser utilizada na recuperação de ambientes de marismas e manguezais degradados por atividades antrópicas (Mendonça & Costa, 2008), bem como no controle da ação erosiva do mar e na estabilização de sedimentos dragados depositados em regiões estuarinas e costeiras (Azevedo et al., 2016).

Anderson et al. (2002) avaliaram ao longo de 16 meses, em um experimento de campo na costa atlântica dos Estados Unidos, a capacidade de *S. alterniflora* degradar TBT em sedimento dragado contaminado com 250 ng TBT.g⁻¹. Estes autores observaram um aumento do teor de TBT no tecido ao longo de 9 meses até um pico de 43 ng.g⁻¹ nas raízes (peso seco) e de 1,2 ng.g⁻¹ nas folhas, sendo que DBT e MBT durante todo o período experimental permaneceu abaixo do limite de detecção. Como as quantidades de TBT absorvido no tecido e de TBT reduzido no solo contaminado somadas não foram maiores do que a degradação do TBT no solo de tratamento controle sem presença da planta, os autores concluíram que a maior parte da degradação do TBT foi mediada por micro-organismos no solo. Contrastantemente, Carvalho et al. (2010) demonstraram uma persistência muito maior de TBT em sedimentos superficiais (até 15 cm de profundidade) não vegetados de marismas na costa Portuguesa (0,66-2,14 ngTBT.g⁻¹) do que em sedimentos colonizados por *Spartina maritima* (TBT abaixo do limite de detecção; 0,008 ng.g⁻¹). Estes autores também encontraram ausência de DBT e valores de MBT que variaram de 0,71 a 9,5 ng.g⁻¹ em áreas vegetadas, concluindo que a presença de *S. maritima* promoveu a remoção/degradação de TBT e DBT no sedimento. Os resultados conflitivos apresentados acima podem ser consequentes de diferentes condições de alagamento ou aporte de adicionais contaminantes pelas marés. São necessários estudos controlados em laboratório para o esclarecimento do papel fitorremediador do TBT de plantas do gênero *Spartina*, permitindo avaliar a viabilidade de seu plantio para o controle deste composto em áreas costeiras contaminadas.

A *S. alterniflora* está presente em áreas portuárias onde há registros de contaminação do sedimento por compostos butilestânicos (Castro et al., 2012; Santos et

al., 2016), conseqüentemente, plantas da espécie podem ser expostas a concentrações de desses compostos muito maiores do que as testadas para esta espécie anteriormente (Anderson et al., 2002) e para outras halófitas marinhas (Carvalho et al., 2010; Francois et al., 1989). A tolerância de *S. alterniflora* e o seu papel na degradação de TBT em altas concentrações no solo ainda precisam ser avaliados.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição às altas concentrações do tributilestanho (TBT) no crescimento da grama halófito *S. alterniflora*, bem como o potencial de remediação de solos contaminados com altas concentrações de TBT por esta espécie em condições controladas de laboratório.

2.2. Objetivos Específicos

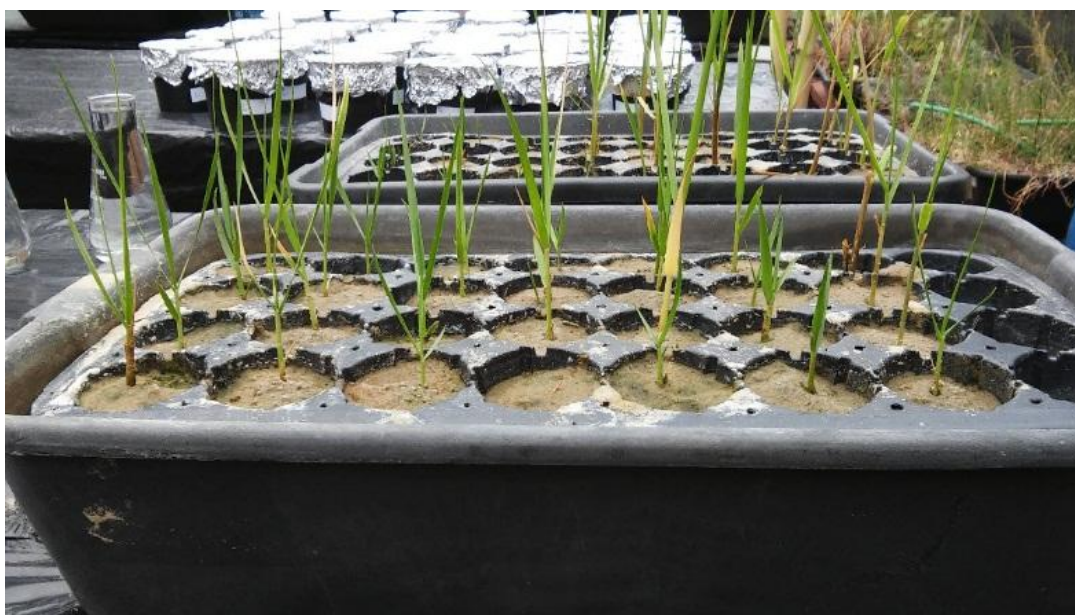
- Verificar os efeitos da exposição às altas concentrações do tributilestanho (TBT) no desenvolvimento vertical dos colmos, produção e mortalidade foliar, formação de perfilhos, produção de biomassa de colmos e de raízes da halófito *S. alterniflora* em condições controladas de laboratório.

- Avaliar se a presença da *S. alterniflora* em solo contaminado por TBT pode promover a redução e/ou degradação deste composto (i.e., formação dos metabólitos DBT e MBT).

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparo das mudas

As mudas de *S. alterniflora* foram obtidas através de propagação vegetativa de plantas coletadas na marisma da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS, 32°02'06"S e 52°05'55"W), conforme o protocolo de Azevedo et al. (2016). As plantas coletadas foram separadas em mudas contendo uma haste (colmo) com raízes e fragmentos de rizomas. Essas mudas foram acomodadas em bandejas plásticas, contendo solo resultante da mistura de areia fina de praia e composto orgânico da marca Humosolo Vida® numa proporção de 1:1 (Fig.1). As mudas foram cultivadas por dez semanas (de 29/09 à 13/12/2015), em estufa não climatizada, sujeitas no período às temperaturas médias (\pm erro padrão) mínimas noturnas de $16,0 \pm 3,5$ °C e máximas diurnas $29,8 \pm 3,8$ °C. O solo das bandejas foi mantido em condição saturada através da irrigação com água da torneira, sendo solução nutritiva de Hoagland adicionada às bandejas na sétima semana para um melhor desenvolvimento da planta.



Figural: Cultivo de mudas de *Spartina alterniflora* em bandejas plásticas.

3.2. Características do solo de cultivo e fortificação com TBT

Para o cultivo de *S. alterniflora* do presente experimento, a granulometria do solo preparado foi estimada pelo método de peneiramento descrito por Suguio (1973). A mistura de solo e composto orgânico utilizada no cultivo continha 3,8% de areia grossa, 3,6% de areia média, 90,1% de areia fina e 2,5% de fração silte/argila.

O solo utilizado foi fortificado com concentrações de TBT nominais iniciais que correspondessem aos limites de nível 1 (100 ngTBT.g⁻¹) e 2 (1000 ngTBT.g⁻¹) estabelecidos na resolução CONAMA 454/2012 para material a ser dragado e ser disposto em águas sob jurisdição nacional. Esta resolução define o nível 1 como “...limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota”, ou seja, concentração no solo até a qual nenhum efeito tóxico seria observado. O nível 2 caracteriza “...limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota”, consequentemente caracterizando a menor concentração em que um efeito tóxico é observado. O termo biota não diferencia animais e plantas, e a própria resolução no seu artigo 31 estabelece que valores orientadores nacionais para a classificação do material a ser dragado, inclusive no que se refere ao tributilestanho (TBT), deveriam ser revisados em até cinco anos após sua publicação. Ou seja, esta revisão deveria ocorrer até o final de 2017. Valores de TBT com as magnitudes dos níveis 1 e 2 citados na CONAMA 454/2012 ocorrem em sedimentos de portos brasileiros (Castro et al. 2012; Sant’anna et al., 2014), onde *S. alterniflora* está presente.

Para a fortificação foi preparada uma solução estoque de TBT a partir de uma massa de 0,050 g de tributilestanho diluída em acetona, para realização da fortificação do solo e obtenção dos níveis de concentrações nominais iniciais pretendidos de 100 e 1000 ngTBT.g⁻¹, denominados, respectivamente, nível baixo e alto. A solução foi analisada para averiguação de que a mesma continha apenas o TBT em sua composição.

A partir de um determinado volume da solução estoque o solo preparado foi fortificado para se atingir cada concentração pretendida. Após a fortificação o solo passou pelo processo de rolamento de frascos, assim como o solo com o controle (0 ngTBT.g⁻¹), conforme o protocolo USEPA (2001), esse processo se deu em uma mesa de rolamento programada para 36 rotações por minuto (Fig. 2).

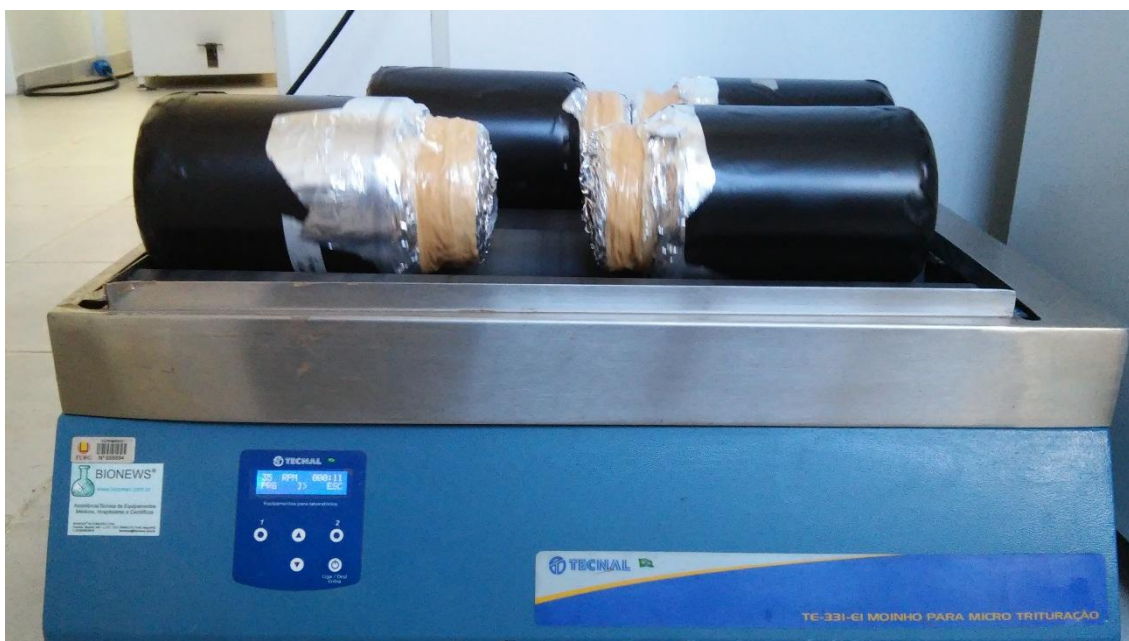


Figura 2: Mesa de rolamento, onde foi realizada a homogeneização da solução de fortificação no solo.

Para cada nível de TBT, foram fortificados 10 kg de solo, essa massa foi distribuída em 4 frascos de vidro que foram devidamente vedados e protegidos da luminosidade. Para cada frasco 25% da massa do solo foi separada, seca e o teor de umidade retirado por gravimetria e adicionado um volume da solução estoque de TBT preparada para a fortificação, em seguida o frasco passou pelo processo de rolamento por 1 hora. Após esse período foi adicionado os 75% de solo da massa restante de cada frasco e a umidade retirada foi recomposta utilizando água destilada. Todo o volume do solo foi então para a mesa de rolamento por mais 6 horas. Após a fortificação os frascos com solos foram preservados em um freezer por até três dias e após este período o solo foi coletado para serem transferidos para os vasos do experimento.

Após a fortificação, um frasco de cada nível de TBT foi escolhido aleatoriamente e foram retiradas 3 alíquotas do solo de cada frasco para verificação da homogeneidade da fortificação. As alíquotas foram coletadas na superfície, no meio e no fundo de cada frasco. As amostras foram acondicionadas em embalagens de papel alumínio em um freezer até sua utilização. A posterior análise química dos solos (seção 3.4) mostrou que os níveis de concentração de TBT inicial foram diferentes dos nominais, sendo os valores médios iniciais reais no nível baixo de $179 \pm 27 \text{ ngTBT.g}^{-1}$ e no nível alto de $835 \pm 55 \text{ ngTBT.g}^{-1}$.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores dos parâmetros de umidade (por gravimetria após secagem em estufa), salinidade (medição em extrato 1:2 de solo e água destilada com condutivímetro Hannah HI 9835) e do teor de carbono orgânico (COT; em analisador elementar CHNS/0 da Perkin Elmer, conforme GRAY 1981), avaliados de amostras coletadas aleatoriamente em cada concentração de TBT (controle, nível baixo e alto), nos tempos de 0, 60 e 90 dias de cultivo.

Tabela 1: Valores médios globais (mínimos - máximos) da umidade, condutividade e teor de carbono (%C) dos solos nos vasos dos diferentes tratamentos de TBT observados durante o experimento. n=10, exceto para teor de carbono onde n=6. Dados de vasos sem e com plantas foram reunidos.

| Parâmetros | Controle | Nível baixo | Nível alto |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Umidade (%) | 40,70 (27,53-69,63) | 39,35 (20,21-47,90) | 37,20 (29,87-51,07) |
| Salinidade (mS.cm ⁻¹) | 1,55 (0,82-2,44) | 1,53 (0,89-2,35) | 1,44 (0,90-2,44) |
| % C | 2,60 (1,56-4,27) | 4,72 (1,85-11,04) | 3,49 (1,94-4,55) |

3.3. Montagem dos tratamentos experimentais

Plantas de *S. alterniflora* foram cultivadas em estufa não climatizada por 90 dias (entre dezembro 2015 a março de 2016), sendo que as médias de temperatura mínima noturna e máxima diurna dentro da estufa foram de, respectivamente, $18,0 \pm 3,8$ °C e $31,5 \pm 4,7$ °C, com uma incidência média da radiação solar na estufa no período de cultivo de 12,04 MJ/m²/dia.

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). Foram confeccionados 10 vasos com plantas e 10 vasos sem plantas para cada um dos três níveis de TBT (“0” = controle, nível baixo e alto de TBT); cada vaso foi revestido internamente com papel alumínio e preenchidos com 450g de solo, com o auxílio de uma espátula de aço inox. Em cada vaso vegetado foi

transplantada uma muda vegetativa, cultivada inicialmente, composta por um colmo (haste com folhas) com rizoma e raízes. Os vasos foram colocados dentro de pratos de vidro e irrigados em dias alternados, através do preenchimento dos pratos de vidro com 50 ml de água destilada. Adicionalmente, uma vez por mês os vasos foram irrigados com solução de Hoagland plena, para suplementação de nutrientes necessários ao melhor desenvolvimento das plantas (Fig. 3).

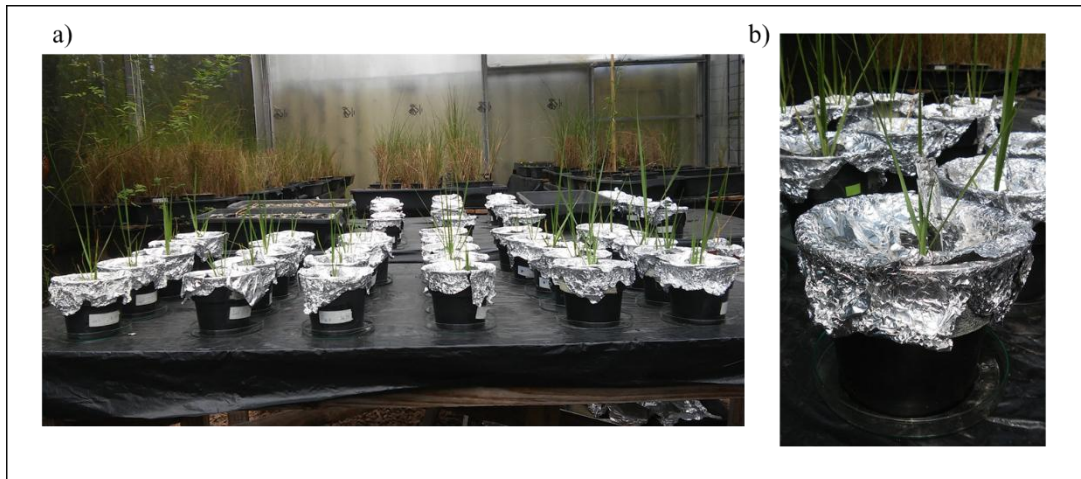


Figura 3: Cultivo de *Spartina alterniflora* em estufa (a); detalhamento da *Spartina alterniflora* em vaso devidamente preparado para o cultivo em solo contaminado com TBT (b).

Aos 60 e 90 dias de cultivo foram coletados aleatoriamente de 5 vasos de cada nível de TBT, o solo de cada vaso que foi cuidadosamente retirado e colocado em sacos de papel alumínio. Todas as plantas de *S. alterniflora* (dos vasos coletados e dos não coletados) tiveram medidas às alturas (comprimento em “cm” da maior folha a partir da base do colmo) da haste mãe (muda original) e dos perfilhos, o número de perfilhos formados, além do número total de folhas vivas e mortas da haste mãe e dos perfilhos em cada vaso. A altura da haste mãe e o somatório das alturas dos perfilhos foram utilizados como índices de área foliar. De forma a permitir uma melhor visualização da mortalidade de folhas, entre datas de coleta, após a contagem as folhas mortas estas foram gentilmente separadas das hastes e removidas dos vasos. As raízes das plantas dos vasos coletados foram separadas e lavadas com água destilada. Tanto as amostras de

solo como das plantas foram acondicionadas em sacos de papel alumínio e preservadas sob-refrigeração até serem levadas ao laboratório, onde foram colocados em um freezer.

Adicionalmente as coletas aos 60 e 90 dias de cultivo, no dia “zero” todas as plantas tiveram a biometria quantificada e foram aleatoriamente obtidas três (3) amostras de plantas (com folhas e raízes) do mesmo lote utilizado para o plantio para biometria e estimativa de biomassa vegetal. Nesta data, foram também obtidas três (3) amostras de solo do nível baixo e (3) amostras do nível alto de TBT. Consequentemente, o desenho experimental para avaliação dos efeitos do TBT no crescimento das plantas foi fatorial duplo, com 3 níveis do contaminante (0, nível baixo e nível alto) e 3 datas de avaliação do desenvolvimento das plantas (0, 60 e 90 dias). A avaliação da taxa de degradação dos butilestânicos foi feita separadamente para cada nível de TBT nos solos contaminados e um desenho experimental fatorial duplo com um tratamento controle inicial adicional. O fator data de avaliação dos contaminantes tinha 2 níveis (60 e 90 dias), a presença das plantas de *S. alterniflora* tinha 2 níveis (com e sem plantas) e o tratamento controle inicial adicional foi constituído pelas amostras do solo fortificado no dia “zero”.

Todo o resíduo gerado durante a montagem do experimento e análise química posterior foi devidamente, armazenado até o recolhimento pela empresa responsável, contratada pela FURG para o descarte adequado.

3.4. Avaliação da Biomassa

As amostras de folha e raízes foram devidamente limpas da adsorção de solo, secas em um liofilizador (Liotop - L101) e pesadas em balança de precisão (mg) para determinação da biomassa seca.

3.5. Análises químicas

A solução utilizada na fortificação do solo preparado foi analisada no presente estudo, não seguindo todas as etapas de preparação de amostra por se tratar da análise de padrão, assim a mesma foi seguida a partir da etapa de introdução de brometo de pentilmagnésio em 1 mL da e os compostos foram também analisados por cromatografia gasosa utilizando o mesmo equipamento a ser mencionado para a análise do solo.

Os compostos butilestânicos (TBT, DBT e MBT) foram analisados em três réplicas do solo (vasos), do controle (solo não vegetado), de cada nível de TBT e o

controle do solo vegetado e cada tempo de cultivo (0, 60 e 90 dias). Durante toda a análise foram utilizadas vidrarias e instrumentação de metal para evitar a contaminação devido à possível presença de organoestânicos em materiais plásticos. A descontaminação de todo material utilizado ocorreu por lavagem em banho de Extran (10%) por 24 horas, seguido de banho em ácido de nítrico (10%) por mais 24 horas, seco em estufa (35° C). O papel alumínio de revestimento dos vasos foi calcinado em mufla a 450 °C por 6 horas, sendo todos os materiais que não eram apropriados para serem muflados foram lavados três vezes com acetona e hexano. Antes das análises químicas as amostras de solo foram secas em um liofilizador (Liotop - L101), sendo posteriormente desagregadas e homogeneizadas. A análise dos butilestânicos seguiu o protocolo de extração descrito em Castro et al. (2015). Dois gramas de amostra em frascos âmbar foram fortificados com 100µL (1000 ng.mL⁻¹) do padrão de recuperação tripropilestano (TPrT). Após 30 minutos de interação do padrão com a matriz foi realizada uma extração com 15 mL de tolueno 0,05% em metanol e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, os frascos contendo as amostras foram agitados em vórtex e permaneceram em banho de ultrassom por 15 minutos (40°C) e centrifugado por 10 min a 3250 rpm, procedimento realizado três vezes.

O sobrenadante foi transferido para 150 mL de solução NaCl 10% em funis de separação, onde foi realizada uma extração líquido-líquido com 20 mL diclorometano. Esta extração se repete três vezes e a fase orgânica do extrato foi recolhida em balão, passando por sulfato de sódio anidro. O volume do extrato recolhido foi transferido para frascos apropriados e adicionados 5 mL de hexano. A mistura de solvente foi evaporada a 1 mL do extrato em sistema de evaporação Syncore, ocorrendo assim a troca de solvente para hexano. O volume de 1 mL foi transferido para frasco âmbar e foi purgado com gás de nitrogênio. Com uma seringa de vidro foram adicionados 2 mL de brometo de pentilmagnésio em solução de éter dietílico 2 mol.L⁻¹ (derivatização com Reagente de Grignard), agitado por 1 min em vortex e deixando em repouso por 30 minutos. A derivatização se fez necessária para obter os butilestânicos em seu estado volátil e mais estável e, assim, possibilitar sua análise por cromatografia gasosa (Godoi et al., 2003).

Em seguida, os frascos foram postos em banho de água gelada, sendo adicionado 1 mL de HCL concentrado e 12 mL de água ultrapura resfriados. Posteriormente foi realizada outra extração líquido-líquido com 5 mL de hexano, etapa que se repete três vezes. O volume do extrato foi concentrado a 1 mL por evaporação em sistema Syncore. O extrato foi transferido para uma coluna de 3,5g de sílica (ativada a 160°C por 6 horas)

e 15 mL de solução hexano/tolueno (1:1) para eluição. Após a purificação do extrato, o mesmo foi evaporado a 0,9 mL e 100 µL do padrão interno (tetrabutilestanho) foi adicionado, sendo avolumado a 1 mL. As concentrações dos butilestânicos do extrato final das amostras foram quantificadas através de um cromatógrafo de fase gasosa equipado com um amostrador automático, injetor Split/Splitless e um detector de espectrometria de massas tipo quadrupolo (CG-MS Perkin Elmer modelo Clarus 500 MS). Os parâmetros instrumentais seguem na Tabela 2.

Tabela 2: 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 | <i>MS</i> |
| 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) |

A temperatura de forno foi mantida em 80°C por 2 minutos e elevada a 300°C à 11°C. min⁻¹. Os íons de monitoramento, tempos de retenção, massas molares utilizadas para identificação dos compostos estão na Tabela 3.

Tabela 3: 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 |
| Dibutilestanhao | 14,14 | 249 | 317 | 319/315 |
| Monobutilestanho | 14,90 | 193 | 317 | 319 |
| Tripropolestanho | 10,90 | 273 | 275 | 277 |
| Tetrabutilestanho | 12,42 | 177 | 233 | 235/291 |

3.6. Análises dos dados

3.6.1. Efeitos do TBT no crescimento da *S. alterniflora*

As taxas de expansão foliar das hastes mãe e dos perfilhos de cada vaso foram estimadas entre datas de coleta pelas diferenças, respectivamente, nas alturas e nos somatórios das alturas de todos os perfilhos. As taxas de natalidade foliar das hastes mãe e dos perfilhos foram estimadas através do valor da diferença entre os números de folhas vivas das datas de coleta, dividido pelo número de dias entre datas. Os valores finais das taxas foram expressos por trinta dias (x30). As taxas de mortalidade das hastes mãe foram calculadas utilizando o mesmo procedimento para o número de folhas mortas. Nenhuma folha de perfilho morreu durante o experimento.

Os resultados dos dados biométricos de altura e número de folhas vivas foram analisados por Análises de Variância (ANOVA) de uma via (Tratamento com TBT) de medidas repetidas. Os números de folhas mortas entre datas de coleta e as taxas de expansão foliar, natalidade e mortalidade foliar para os períodos de 0-60 dias e 60-90 dias foram comparados entre níveis de TBT através de ANOVA de uma via. Os dados de biomassa foliar e de raízes, assim como o percentual da biomassa total da planta alocada para a biomassa foliar foram analisados por ANOVA bifatorial (Tratamento com TBT x Tempo de cultivo). Quando as ANOVAs detectaram diferenças significativas ($p < 0,05$), foi aplicado o teste post-hoc LSD para caracterizar quais médias eram diferentes, considerando 5% de significância. Todas as variáveis de respostas da planta tiveram a normalidade de sua distribuição avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade pelo teste de Levene's. Quando realizada ANOVAs de medidas repetidas a esfericidade dos dados foi testada pelo teste de Mauchly. Os dados foram normalizados quando necessário, assim a para altura da haste mãe foi utilizada a transformação de $\text{Log}_{10}(x+1)$, o somatório das alturas dos perfilhos pela função raiz quadrada $(x+1)$ e biomassa de raiz seca pela função raiz quadrada (x) .

3.6.2 Efeitos remediadores da presença de plantas de *S. alterniflora* em solos contaminados com TBT.

Valores médios e desvios padrões de triplicatas das amostras de sedimento foram calculados em cada tratamento e tempo de cultivo. Separadamente para cada nível de contaminação de TBT, tanto nos vasos sem como nos com a presença de plantas, os teores iniciais do TBT, dos seus metabólitos (DBT e MBT) e da quantidade total de

organoestânicos (OTs), que corresponde ao somatório das concentrações de TBT, DBT e MBT em ngSn.g^{-1} no solo dos vasos, foram comparados com as outras duas datas de coleta ao longo do cultivo através de ANOVAs de uma via. Para conversão em unidades de massa de estanho (Sn), as concentrações de TBT, DBT e MBT foram multiplicadas, respectivamente, pelas razões: 0,36; 0,39; e 0,42.

Os efeitos da presença das plantas de *S. alterniflora*, diferentes níveis de contaminação com TBT e do tempo de cultivo (aos 60 e 90 dias) nos teores de TBT, dos seus metabólitos (DBT e MBT) e na quantidade total de organoestânicos no solo dos vasos foram avaliados através de ANOVAs de três vias. Nestas últimas análises apenas interações de segunda ordem foram inseridas nos modelos das ANOVAs. Quando as ANOVAs detectaram diferenças significativas ($p < 0,05$), foi aplicado o teste post-hoc LSD para caracterizar quais médias eram diferentes, considerando 5% de significância. Para todos organoestânicos foram avaliadas as condições de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene's). Os dados foram normalizados quando necessário. Nas ANOVAs de uma via e trifatoriais as concentrações de MBT foram normalizadas por $\text{Log}_{10}(x+1)$, as concentrações de TBT por $\text{Log}_{10}(x)$, e o total de organoestânicos por $\text{Log}_{10}(x)$.

As taxas de degradação do TBT nos solos dos dois níveis de fortificação entre 0-60 dias e 60-90 dias, nos vasos com e sem a presença das plantas de *S. alterniflora*, foram calculadas através da subtração dos valores médios da concentração do TBT no dia "0" dos valores médios deste composto nos dias 60 e 90, dividindo esta diferença pelo tempo do cultivo.

A conversão do TBT em seus metabólitos (DBT e MBT) no solo foi comparada entre os níveis dos tratamentos (fortificação com TBT, datas de coleta e presença de *S. alterniflora*) através do cálculo das concentrações dos três compostos em unidades de estanho, e estimativa do percentual de cada um em relação à concentração total de organoestânicos presentes.

4. Resultados

4.1 Efeitos do TBT no crescimento da *S. alterniflora*

Nenhuma planta de *S. alterniflora* morreu durante o experimento. As alturas das hastes mãe (Fig. 4a), assim como o número (Fig. 5a) e altura (Fig. 5b) dos perfilhos formados durante o cultivo apresentaram crescimentos significativos ($p < 0,05$) no tratamento controle e nos dois níveis testados do contaminante (todos os resultados de ANOVAS estão disponíveis em tabelas suplementares “Tab.S” apresentadas no Anexo D). Não foram observadas diferenças significativas na altura, nos números de folhas vivas e mortas das hastes mães entre o controle e os níveis baixo e alto de TBT (Tab. S1). O número médio de folhas vivas nas hastes mãe manteve-se entre 4,5 e 5,5 ao longo do cultivo nas três concentrações de TBT (Fig. 4b), entretanto a morte de folhas entre os intervalos de monitoramento (Fig. 4c) indicou uma marcada renovação foliar. Nenhuma folha dos perfilhos morreu durante o experimento.

Ao final dos primeiros 60 dias de cultivo, a taxa de mortalidade foliar das hastes mãe no tratamento controle (0,65 folhas/mês) foi maior do que ($p < 0,05$) das hastes crescendo nos níveis baixo (0,15 folhas/mês) e alto de TBT (0,03 folhas/mês) (Tab. 4A). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de natalidade, perfilhamento expansão (crescimento vertical) foliar entre as concentrações de TBT testadas (Tab.4). As taxas de natalidade e mortalidade foliar indicaram que 27,1% das folhas das hastes mãe não expostas ao TBT foram renovadas nos primeiros 60 dias de cultivo, enquanto que apenas 9,1 – 15,2 % das folhas das hastes expostas ao TBT foram repostas (Tab. 4). Considerando o período entre 60 e 90 dias de cultivo não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos de TBT nas taxas de natalidade e mortalidade foliar, perfilhamento e expansão foliar (Tab. 4).

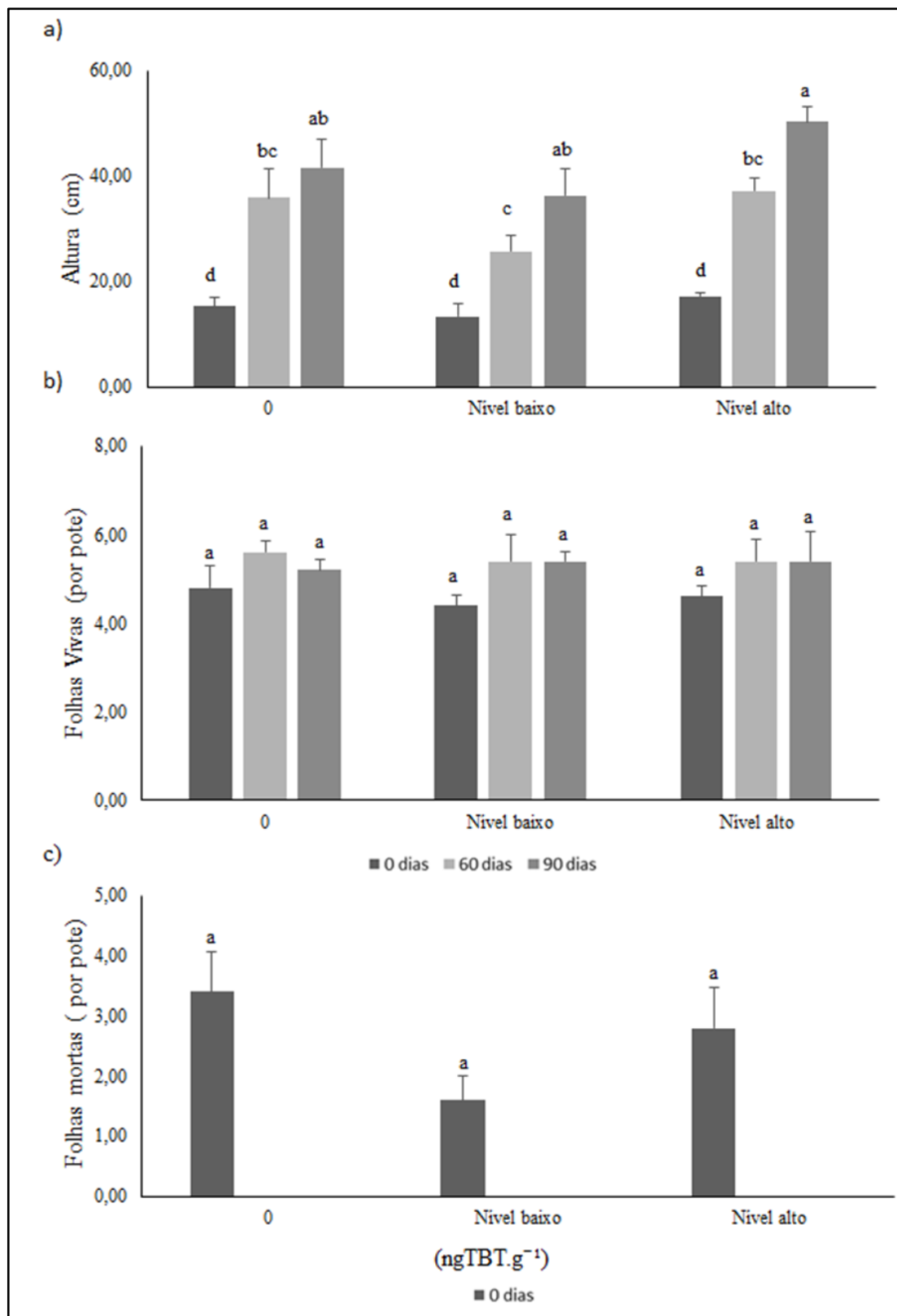


Figura 4: Médias (\pm erros padrões; n=5) das alturas (a), número de folhas vivas (b) e de folhas mortas (c) das hastes mãe de *Spartina alterniflora* ao longo dos 90 dias de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.

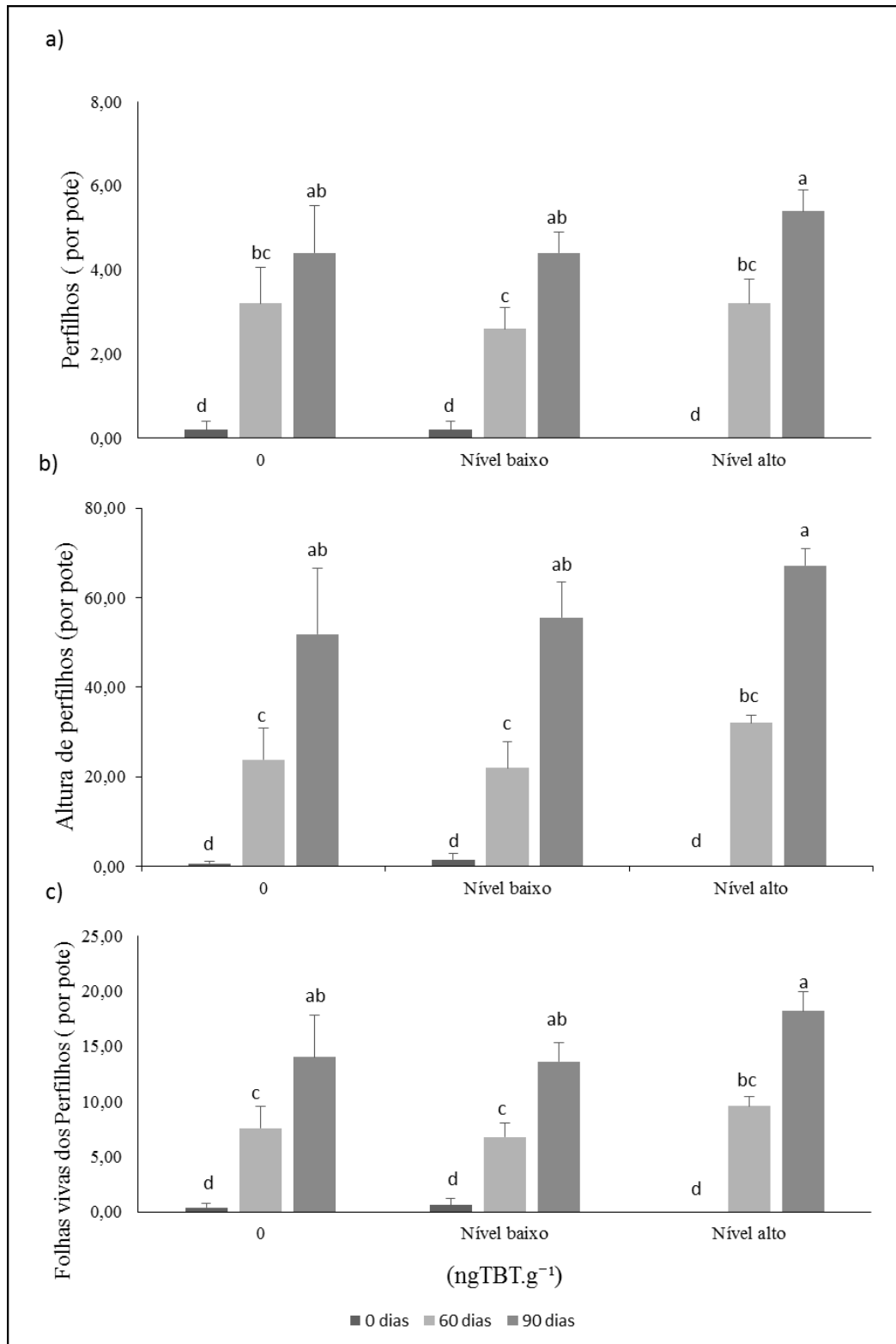


Figura 5: Médias (\pm erros padrões; $n=5$) do número de perfilhos formados das hastes mãe de *Spartina alterniflora* (a), do somatório do comprimento de todas as folhas dos perfilhos (b) e do número de folhas vivas dos perfilhos (c) ao longo dos 90 dias de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.

Tabela 4: Médias (\pm erro padrão; n=5) das taxas de natalidade (TN) e mortalidade (TM) foliar, perfilhamento e expansão foliar das hastes mãe de *Spartina alterniflora*, calculadas entre os intervalos de 0 a 60 dias (A) e 60 a 90 dias (B) de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Resultados das Análises de Variância de todos os parâmetros entre concentrações de TBT e estimativas de renovação foliar das plantas nos períodos de cultivo são apresentados. Apenas hastes mãe apresentaram mortalidade foliar.

(A)

| Período de cultivo (0 a 60 dias) | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------|-------|
| Concentração (ngTBT.g ⁻¹) | 0 | Nível baixo | Nível alto | F | p |
| TN Foliar (folhas/mês) | | | | | |
| Planta mãe | 1,1 \pm 0,57 | 0,09 \pm 0,52 | 0,95 \pm 0,28 | 0,486 | 0,621 |
| Perfilhos | 3,95 \pm 1,38 | 2,65 \pm 1,40 | 3,47 \pm 1,70 | 1,924 | 0,165 |
| Total | 5,05 \pm 1,25 | 3,45 \pm 1,36 | 4,42 \pm 1,60 | 3,247 | 0,055 |
| TM Foliar (folhas/mês) | 0,65 \pm 0,41 ^a | 0,15 \pm 0,41 ^b | 0,03 \pm 0,35 ^{ab} | 4,283 | 0,024 |
| Perfilhamento (indivíduos/mês) | 1,5 \pm 0,67 | 0,95 \pm 0,60 | 1,45 \pm 0,55 | 2,510 | 0,100 |
| Expansão foliar (cm/mês) | 25,4 \pm 9,3 | 17,9 \pm 6,3 | 23,3 \pm 7,1 | 2,584 | 0,094 |
| Renovação foliar (%) | 27,08 | 9,09 | 15,22 | | |

(B)

| Período de cultivo (60 a 90 dias) | | | | | |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------|-------|
| Concentração (ngTBT.g ⁻¹) | 0 | Nível baixo | Nível alto | Fc | p |
| TN FOLIAR (folhas/mês) | | | | | |
| MÃE | 0,20 \pm 0,87 | 1,20 \pm 0,45 | 1,20 \pm 0,87 | 1,795 | 0,212 |
| PERF | 6,40 \pm 4,56 | 6,80 \pm 3,50 | 8,60 \pm 1,32 | 0,470 | 0,636 |
| TOTAL | 6,60 \pm 4,72 | 8,00 \pm 3,40 | 9,80 \pm 2,59 | 0,953 | 0,413 |
| TM FOLIAR (folhas/mês) | 0,60 \pm 1,14 | 1,20 \pm 1,10 | 1,20 \pm 0,45 | 0,667 | 0,531 |
| TN PERFILHO (indivíduos/mês) | 1,20 \pm 1,10 | 1,80 \pm 1,79 | 2,2 \pm 1,10 | 0,679 | 0,526 |
| Expansão foliar (cm/mês) | 16,86 \pm 9,22 | 22,12 \pm 2,96 | 24,15 \pm 3,80 | 1,961 | 0,183 |
| Renovação foliar (%) | 31,60 | 20,33 | 32,24 | | |

A biomassa foliar de *S. alterniflora* aumentou significativamente ao longo dos 90 dias de cultivo, não sendo detectadas diferenças significativas pela ANOVA nos valores médios entre os níveis de TBT (Fig. 6A; Tab. S1). Quanto à biomassa de raízes (Fig. 6B), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos primeiros 60 dias de cultivo, porém aos 90 dias de cultivo a ANOVA detectou uma maior biomassa de raízes no nível baixo de TBT do que no controle ou no nível alto do TBT (Fig. 6B). A interação significativa ($p < 0,001$) teor de TBT X tempo de cultivo confirma o mais rápido crescimento nos últimos 30 dias de cultivo da biomassa de raízes no nível baixo de TBT em relação aos demais níveis deste contaminante.

A percentagem da biomassa da planta alocada para folhas variou nos tempos de cultivo e entre os níveis de TBT. Menores investimentos em biomassa foliar ocorreram no final do cultivo (90 dias), particularmente no nível baixo de TBT, o que é coerente com a maior biomassa de raízes nas mesmas condições, em relação ao controle e ao maior nível de TBT (Tab.5; Tab. S1).

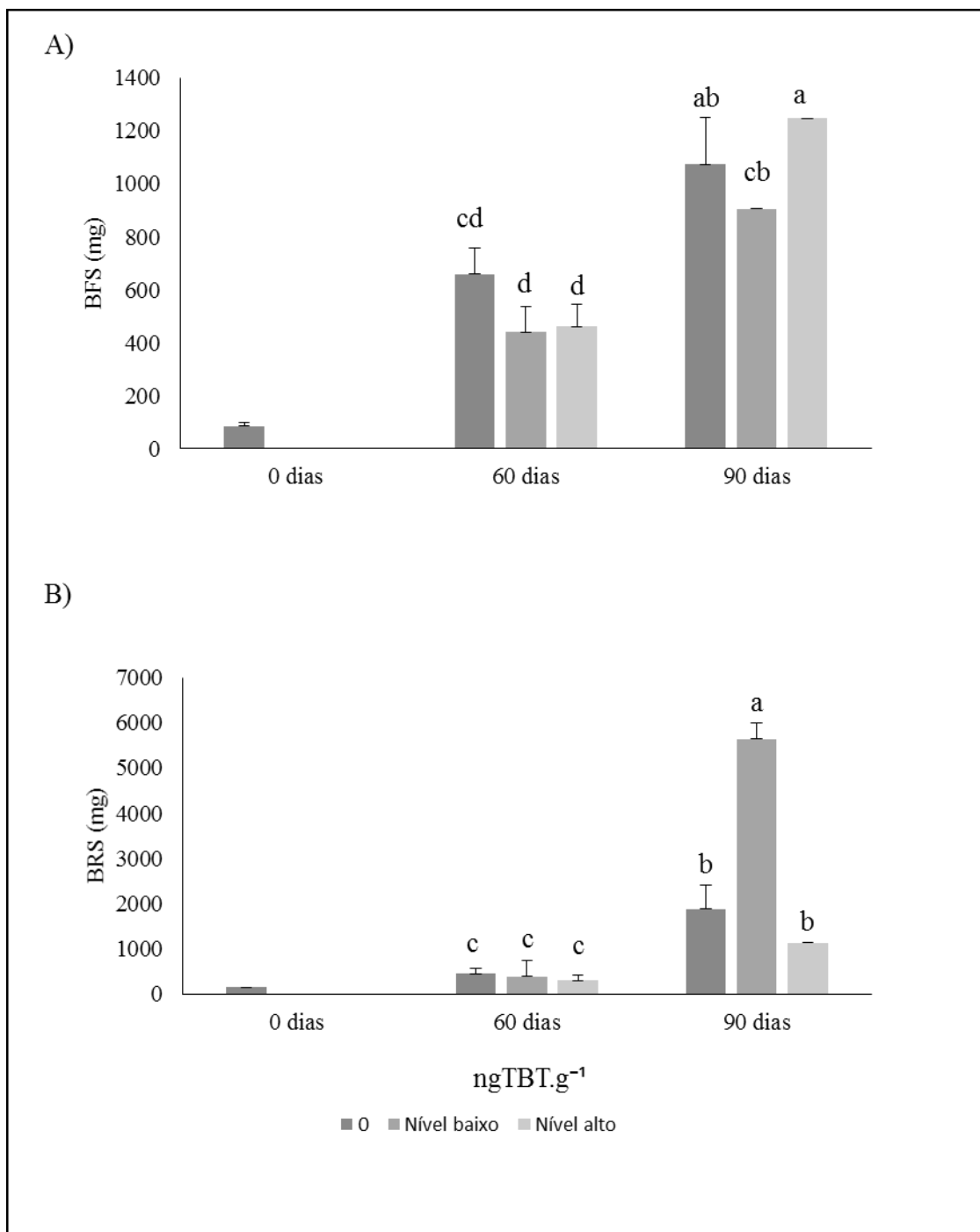


Figura 6: Médias (\pm erros padrões; $n=5$) das (A) biomassas de folhas secas (BFS) e de (B) raízes (BRS) das plantas de *Spartina alterniflora* ao longo dos 90 dias de cultivo nas diferentes concentrações de TBT. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.

*Médias de 0 dias de cultivo não foram consideradas na Análise de Variância.

Tabela 5: Médias (\pm erro padrão; n=5) da percentagem de biomassa foliar das plantas de *Spartina alterniflora* cultivadas em diferentes concentrações de TBT aos 60 e 90 dias do experimento. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias conforme o teste LSD.

| Percentagem de biomassa foliar | | | |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tempo | Níveis de TBT | | |
| | 0 (ng.TBT.g ⁻¹) | Baixo | Alto |
| 60 dias | 61,57 \pm 3,44 ^a | 55,43 \pm 3,83 ^a | 61,46 \pm 0,98 ^a |
| 90 dias | 40,51 \pm 6,08 ^b | 13,84 \pm 1,27 ^c | 52,79 \pm 2,77 ^a |

4.2. Efeitos remediadores da presença de plantas de *S. alterniflora* em solos contaminados com TBT

Foram detectadas concentrações de MBT e DBT nos solos dos níveis baixo e alto de TBT no tempo zero do experimento (Tab. 6-7). A solução de TBT utilizada para a fortificação do solo foi analisada para verificação do conteúdo do contaminante, através da identificação dos íons de monitoramento dos compostos pelo cromatograma de cada um dos mesmos (Fig. 7A-C), sendo detectado qualitativamente apenas tributilestanho (íon 179), ficando assegurado que toda concentração de DBT e MBT medida no tempo zero do experimento foi proveniente da degradação do TBT nos solos após a fortificação.

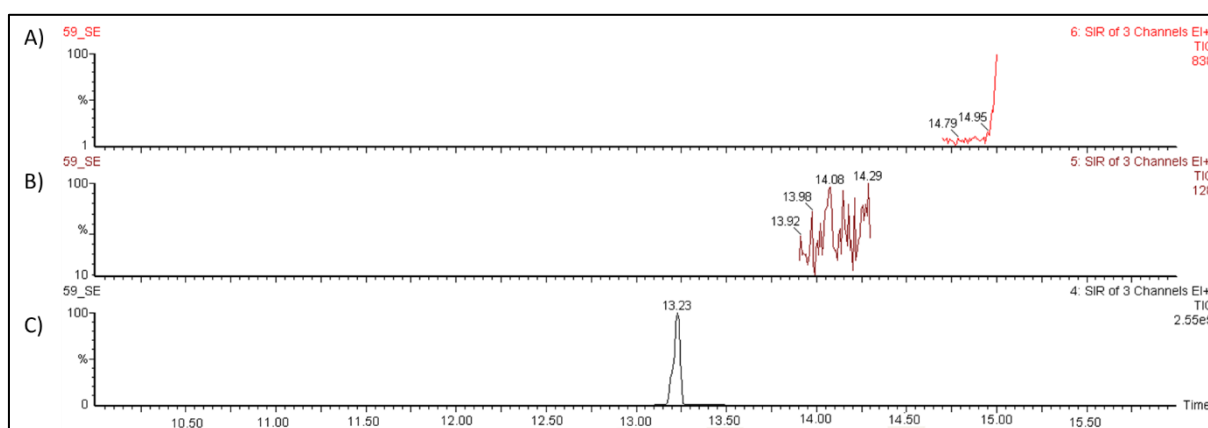


Figura 7: Cromatograma do TBT (A), DBT (B) e MBT (C), da solução estoque preparada para uso na fortificação do solo.

No dia do plantio (tempo zero) amostras do solo fortificado com TBT foram coletadas dos frascos de fortificação do solo para verificação das concentrações

nominais e da homogeneidade da fortificação dos solos. A avaliação da homogeneidade da fortificação foi realizada através dos coeficientes de variação das concentrações médias dos organoestânicos em um dos frascos preparados para cada nível de TBT (Tab. 6). As amostras de solo dos frascos onde foi avaliada a homogeneidade da fortificação mostrou uma grande variabilidade, cujos coeficientes de variação apresentaram maiores valores para os butilestânicos no nível baixo de TBT (10,04-173,20% dos valores das médias) do que no nível alto (5,73-36,95).

Tabela 6: Média e coeficiente de variação (CV) das concentrações dos butilestânicos nos frascos onde foi avaliada a homogeneidade da fortificação. As médias foram obtidas de três amostras de um frasco de cada nível de fortificação.

| Butilestânicos (ng.g ⁻¹) | Nível baixo | | Nível alto | |
|--------------------------------------|-------------|-------|------------|-------|
| | Média | CV | Média | CV |
| TBT | 69,83 | 55,09 | 558,20 | 9,55 |
| DBT | 47,93 | 10,04 | 83,94 | 5,73 |
| MBT | 10,75 | 173,2 | 50,37 | 36,95 |

Entretanto avaliando os valores médios iniciais dos butilestânicos estimados na coleta aleatória das amostras de solos de diferentes vasos do plantio no dia “0” (Tab. 7), ambos os níveis de fortificação, apresentaram um maior grau de homogeneidade e coeficientes de variação entre 8,58-18,52%.

A diferença entre os valores reais (medidos) dos níveis baixo e alto de fortificação do TBT nos solos dos vasos no dia “0” (179.04 e 834.72 ngTBT.g⁻¹) dos valores nominais deste contaminante (100 e 1000 ngTBT.g⁻¹), em parte pode ser explicado pela formação de seus metabólitos (MBT e DBT). Considerando a massa molar de estanho nos butilestânicos, o teor médio da soma de todos butilestânicos nas amostras do nível alto de TBT no dia “0” de cultivo (361,81 ngSn.g⁻¹) foi apenas 0,5% maior do que o valor nominal (360,00 ngSn.g⁻¹). Entretanto, para o nível baixo do TBT o mesmo calculo mostra uma sobrecarga de butilestânicos (média medida= 84,84 ngSn.g⁻¹), valor cerca de 136% maior do que o valor nominal (36,00 ngSn.g⁻¹).

Tanto no nível baixo como alto de contaminação de TBT, as concentrações de TBT e do total dos organoestânicos nos solos (Tab. 7, Tab. S2-S3) reduziram significativamente ao longo dos 90 dias de cultivo. No nível baixo esta queda ocorreu

nos primeiros 60 dias, mas entre 60 e 90 dias de cultivo o teor médio de TBT se manteve estável. No nível alto do contaminante foi observado um menor teor de TBT somente aos 90 dias de cultivo.

A Análise de Variância trifatorial dos solos fortificados com os dois níveis de TBT, coletados dos vasos com e sem plantas de *S. alterniflora* aos 60 e 90 dias do experimento, além de corroborar a redução significativa nos teores médios de TBT com o passar do tempo, detectou as maiores concentrações mantidas nos solos fortificados com o maior nível de TBT (Tab. 7). Apesar de não ocorrer uma diferença significativa entre as médias globais (todas as amostras de 60 e 90 dias) dos vasos com e sem plantas de *S. alterniflora*, a interação significativa entre Tempo de cultivo x Presença de plantas sugere um efeito remediador das plantas sobre o TBT à medida que elas aumentaram sua biomassa (Fig. 8).

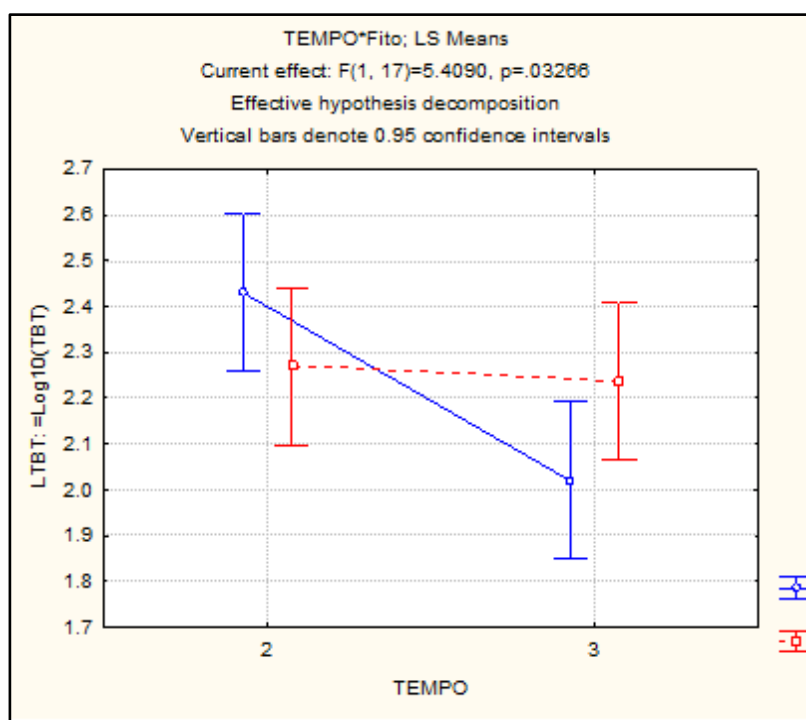


Figura 8: Interação tempo de cultivo 60 (2) e 90 (3) dias e a presença da planta (linha azul) e sem a presença (linha vermelha) da planta no solo.

Os resultados mostram uma redução significativa de TBT aos 90 dias de experimento (Tab. 7), sendo que a taxa de degradação do TBT maior no período de 60-90 dias do experimento em solos com altos teores de TBT e com a presença de plantas do que em solos sem plantas (Fig. 9). Nestes últimos 30 dias, quando as plantas de *S.*

alterniflora apresentaram um grande ganho de biomassa de folhas e raízes, no solo com alto nível de contaminação e presença da planta, a taxa de degradação do TBT (7,54 ngTBT.g⁻¹dia⁻¹) foi cerca de 30% mais rápida do que nos solos com o mesmo grau inicial de contaminação, mas sem plantas ou nos tratamentos do nível baixo de TBT.

O percentual médio de carbono orgânico (%C) nos solos não variou significativamente entre os níveis de todos os tratamentos analisados (Tab. S4), permanecendo entre 1,8 e 7,4%. (Tab. 1.)

Em paralelo a degradação do TBT no solo, as concentrações de DBT e MBT mostraram marcadas flutuações. A Análise de Variância de uma via ao longo dos 90 dias de cultivo mostrou uma redução significativa na concentração média do DBT somente nos vasos com plantas e no nível alto de contaminação do solo (Tab. 7; Tab. S2). As concentrações de MBT mostraram um aumento significativo com o tempo de cultivo em vasos do nível baixo com e sem presença da planta e em vasos do nível alto apenas sem a presença de *S. alterniflora* (Tab. S2).

As ANOVAs trifatoriais detectaram médias globais significativamente ($p < 0,05$) maiores de DBT e MBT nos solos fortificados com o alto nível de TBT (Tab. 7; Tab. S4). No nível baixo de contaminação com TBT ao longo dos primeiros 60 dias de cultivo, tanto nos vasos com como sem plantas mantiveram teores médios de DBT estáveis, mas no nível alto de TBT os teores de DBT aumentaram significativamente no mesmo período ($p < 0,05$; teste LSD) (Tab. 7). O MBT acumulou-se significativamente no solo dos vasos nos dois níveis de contaminação de TBT ao longo dos primeiros 60 dias de cultivo.

No período de 60 para 90 dias, os teores médios de DBT apresentaram pequenas reduções (não significativas) nos vasos com e sem plantas do nível baixo de TBT, como também nos vasos sem plantas do nível alto do TBT. Contrastantemente, em vasos com plantas do nível alto de TBT o teor médio de DBT reduziu significativamente em 51% nos últimos 30 dias do experimento (Tab. 7). Neste mesmo período, nos níveis baixo e alto de contaminação de TBT, o teor médio de MBT continuou, respectivamente, aumentando e apresentou redução significativa. Este antagonismo é possivelmente responsável pela interação significativa Tempo de cultivo x Nível de TBT observada na ANOVA do MBT (Tab. S4), sendo que a resposta de redução do MBT no nível alto de contaminação de TBT foi muito mais marcada em vasos com plantas. Por exemplo, aos 90 dias, o teor médio de MBT no solo contaminado com o nível alto do TBT e presença de plantas de *S. alterniflora* (39,69 ngMBT.g⁻¹) foi 82% menor do que no solo dos

vasos sem plantas (218,84 ngMBT.g⁻¹) (p< 0,05 teste LSD; Tab. 7). Apesar destes resultados, as análises de ANOVAs trifatoriais dos dados de 60 e 90 dias não foram capazes de detectar um efeito significativo do fator presença de plantas nos teores médios dos três organoestânicos considerados.

Tabela 7: Médias (\pm erros padrões; n=3) concentração dos organoestânicos nos solos fortificados com dois níveis de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*, coletados aos 0, 60 e 90 dias do experimento e do total de organoestânicos (OTs). Para cada organoestânico e OTs letras maiúsculas diferentes ao longo das linhas indicam médias significativamente (p< 0,05) diferentes entre tempos de cultivo, conforme o teste LSD. Letras minúsculas diferentes indicam médias significativamente (p< 0,05) diferentes entre níveis dos tratamentos tempo de cultivo e presença de plantas somente nos tempos 60 e 90 dias.

| Tratamento | | Período de Cultivo (dias) | | |
|-----------------------------|------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Nível baixo | | 0 | 60 | 90 |
| TBT (ng.g ⁻¹) | COM PLANTA | 179,04 \pm 26,92 ^A | 165,17 \pm 44,38 ^{Abc} | 91,60 \pm 37,57 ^{Ac} |
| | SEM PLANTA | | 77,35 \pm 14,27 ^{Bc} | 93,20 \pm 19,87 ^{Bc} |
| DBT (ng.g ⁻¹) | COM PLANTA | 52,27 \pm 5,25 ^A | 53,88 \pm 4,15 ^{Ab} | 28,59 \pm 28,59 ^{Bb} |
| | SEM PLANTA | | 45,07 \pm 2,73 ^{Ab} | 32,34 \pm 16,22 ^{Ab} |
| MBT (ng.g ⁻¹) | COM PLANTA | 0,00 \pm 0,00 ^B | 30,19 \pm 15,78 ^{ABc} | 81,94 \pm 36,61 ^{Abc} |
| | SEM PLANTA | | 22,15 \pm 11,31 ^{ABc} | 39,58 \pm 2,70 ^{Ac} |
| OTs (ngSn.g ⁻¹) | COM PLANTA | 84,84 \pm 11,74 ^A | 93,15 \pm 24,22 ^{Ab} | 78,54 \pm 40,12 ^{Ab} |
| | SEM PLANTA | | 54,73 \pm 10,95 ^{Bb} | 62,79 \pm 28,55 ^{ABb} |
| Nível alto | | | | |
| TBT (ng.g ⁻¹) | COM PLANTA | 834,72 \pm 54,55 ^A | 498,54 \pm 123,18 ^{Ba} | 156,14 \pm 44,27 ^{Cc} |
| | SEM PLANTA | | 493,52 \pm 115,00 ^{Ba} | 351,41 \pm 72,35 ^{Bab} |
| DBT (ng.g ⁻¹) | COM PLANTA | 99,62 \pm 13,00 ^{AB} | 147,03 \pm 20,14 ^{Aa} | 72,40 \pm 13,61 ^{Bb} |
| | SEM PLANTA | | 140,46 \pm 24,40 ^{Aa} | 132,48 \pm 10,91 ^{Aa} |
| MBT (ng.g ⁻¹) | COM PLANTA | 53,46 \pm 4,59 ^{AB} | 217,38 \pm 18,32 ^{Aab} | 39,69 \pm 33,06 ^{Bc} |
| | SEM PLANTA | | 279,79 \pm 140,03 ^{Aa} | 218,84 \pm 43,56 ^{ABb} |
| OTs (ngSn.g ⁻¹) | COM PLANTA | 361,81 \pm 30,29 ^A | 328,12 \pm 57,68 ^{Aa} | 101,12 \pm 29,82 ^{Bb} |
| | SEM PLANTA | | 349,95 \pm 106,77 ^{Aa} | 270,09 \pm 48,51 ^{Aa} |

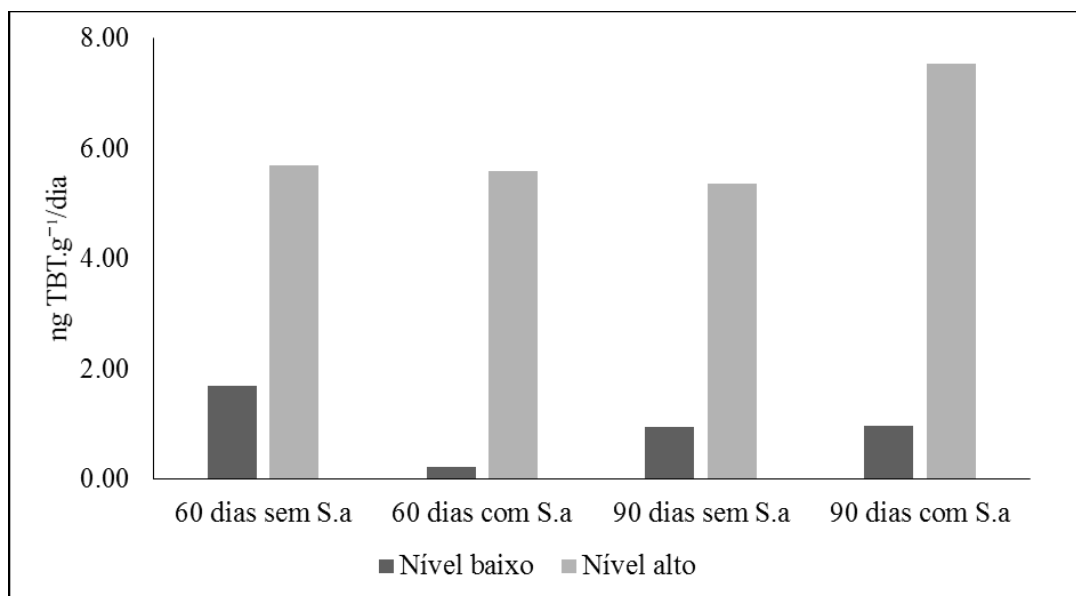


Figura 9: Taxa média de degradação do TBT (n=3) nos solos fortificados com dois níveis de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*, em dois períodos do experimento (0 a 60 dias; e 0 a 90 dias).

No nível alto de contaminação do TBT e na presença de plantas nos vasos, os teores dos organoestânicos totais (em ngSn.g⁻¹) no solo foram reduzidos em cerca de 72% ao longo dos 90 dias de cultivo (Tab. 7). Este valor foi 196% maior do que a redução dos butilestânicos totais de 25,35% observada nos vasos não vegetados. Entretanto, mesmo ocorrendo essa redução significativa, a maior fração dos organoestânicos nos solos ainda é de TBT; e.g. 55% dos organoestânicos totais aos 90 dias de cultivo em solos com nível alto de contaminação do TBT (Fig. 10). Nesse nível de contaminação foi evidente a degradação do TBT em seus metabólicos (DBT e MBT) e a saída dos butilestânicos do solo (Tab. S4).

No nível baixo de contaminação de TBT no solo além de uma redução significativa dos organoestânicos totais ter sido detectada apenas em vasos sem plantas entre os dias 0 e 60 do cultivo (Tab.7), aos 90 dias de cultivo foi observada a maior fração de MBT (48%) nos vasos com a presença de plantas de *S. alterniflora* (Fig. 10).

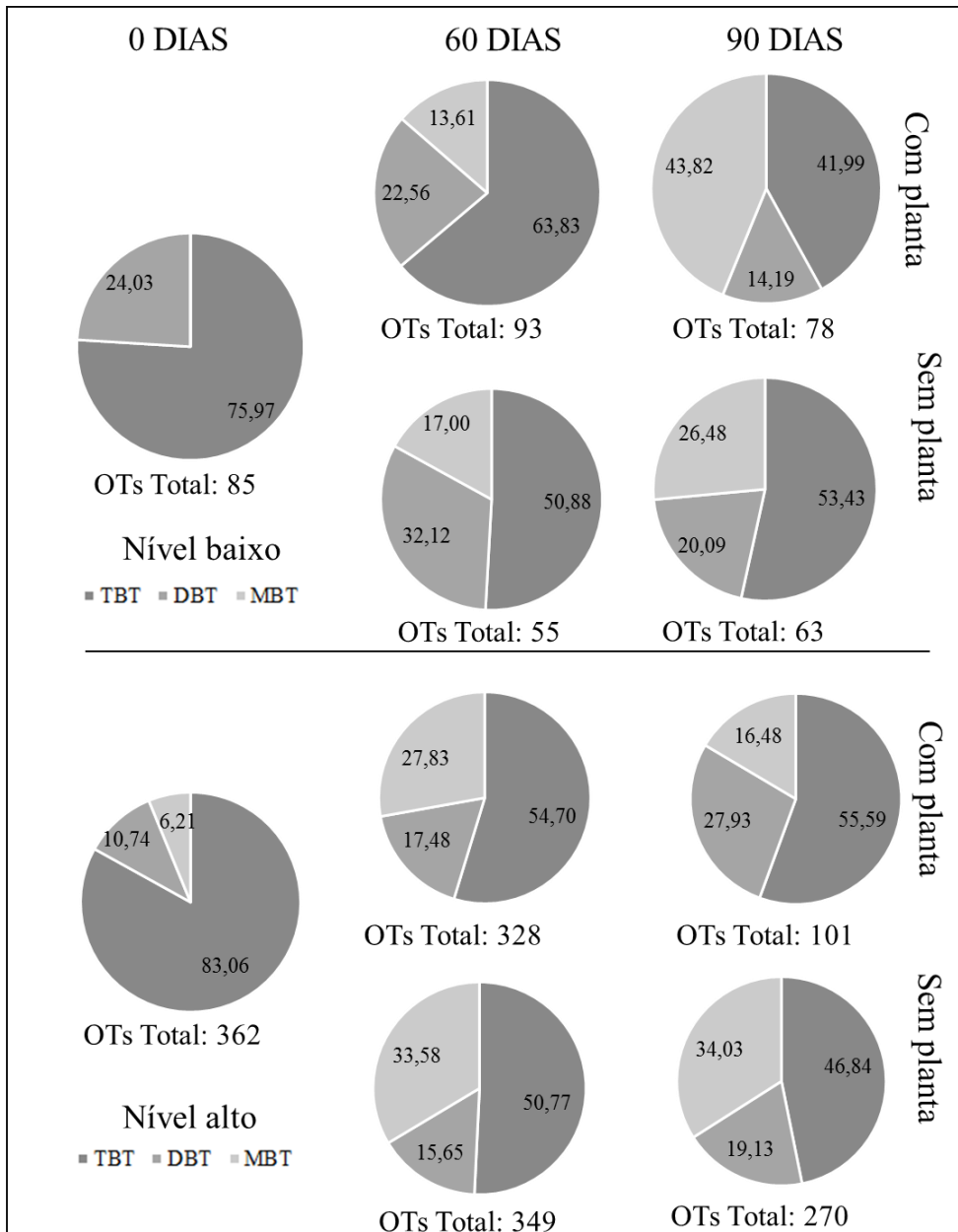


Figura 10: Percentual (%) de organoestrogênicos em 0, 60 e 90 dias de cultivo em solos contaminados com nível baixo e alto de contaminação por TBT nos vasos com e sem a presença de *S. alterniflora*. Valores calculados dos teores médios. A baixo dos gráficos em pizza estão indicador o total de organoestrogênicos em Sn.g⁻¹ de cada tratamento em cada tempo de cultivo.

5. Discussão

5.1 Efeitos do TBT no crescimento da *S. alterniflora*

As plantas de *S. alterniflora* apresentaram elevada tolerância à contaminação do solo por TBT. Uma pequena redução na taxa de mortalidade foliar foi detectada para as hastes mais velhas, aquelas que estavam presentes desde o início do cultivo, crescendo em solos contaminados com TBT, mas apenas nos primeiros 60 dias de cultivo. Anteriormente, ANDERSON et al. (2002) submeteram plantas de *S. alterniflora* a uma contaminação média do sedimento de 250 ngTBT.g⁻¹, condição intermediária aos níveis de contaminação testado no presente trabalho, e não observaram diferenças significativas na formação e altura de hastes, biomassa de raízes e produção de biomassa foliar de plantas após 16 meses de crescimento em solo contaminado e não contaminado de uma marisma.

As condições experimentais permitiram o pleno desenvolvimento das plantas de *S. alterniflora*, sendo o alongamento das hastes e a produção de biomassa foliar indiferente à presença de TBT no solo. As plantas de *S. alterniflora* cultivadas nos vasos do presente trabalho mostraram desenvolvimento em altura (40-70 cm) e número de folhas vivas (3-6 folhas) de suas hastes semelhante ao de plantas crescendo no estuário da Lagoa dos Patos (Marangoni & Costa, 2012; Freitas et al., 2016). O alongamento foliar dos perfilhos (de 16-25 cm/mês) também foi semelhante ao observado para hastes desta espécie, transplantadas para planos entremarés, crescendo no verão-outono do sul do Brasil (Freitas et al., 2016).

Maiores renovações foliares em *S. alterniflora* (aumento de mortalidade foliar sem o comprometimento do número de folhas vivas) frequentemente indicam condições favoráveis ao crescimento desta planta. Por exemplo, Azevedo et al. (2016) observaram que plantas de *S. alterniflora* crescendo em solos ricos em nitrogênio, mas com alta relação N:P (e.g. 14N:1P), mostravam maiores taxas de renovação foliar do que plantas em solos com semelhante teor de nitrogênio mas razão 2N:1P. Estes autores concluíram que, em condições favoráveis ao crescimento, o fósforo (P) no solo pode tornar-se limitante, resultando na mobilização de P das folhas velhas para as folhas jovens e consequentes inibição da fotossíntese e aceleração da senescência das folhas velhas. Semelhantemente, Padgett & Brown (1999) observaram que a fertilização orgânica de solos arenosos de marismas resulta em uma maior formação de biomassa de folhas mortas de *S. alterniflora* sem o comprometimento da biomassa de folhas vivas. Consequentemente, a redução da mortalidade e da renovação foliar de plantas mães que

ocorreu em solos contaminados com TBT nos primeiros 60 dias, sugere que ocorreu um efeito da redução da atividade metabólica das hastes mais velhas da planta.

Antagonicamente, a formação e o desenvolvimento dos perfilhos de *S. alterniflora* em nenhum momento tiveram interferência quanto à presença do contaminante no solo, além de que nos últimos 30 dias de cultivo as plantas de *S. alterniflora* crescendo no nível baixo de TBT (contaminação inicial de 179,04 ngTBT.g⁻¹) apresentaram um crescimento muito maior da biomassa de raízes do que nos demais níveis de TBT. É possível que a presença do composto neste nível de concentração tenha beneficiado a maior biomassa de raízes da *S. alterniflora*. Efeitos positivos do TBT no desenvolvimento de outras plantas já foram descritos na literatura. Lespes et al. (2009) observou um aumento de biomassa foliar das plantas de alface (*Lactuca sativa* var. *capitata*) com o aumento do teor de TBT no solo de 54,8 à 137 ng.g⁻¹ após 54 dias de cultivo. Apesar destes autores não tentarem interpretar o resultado, eles mostraram que as plantas de alface acumularam (principalmente nas folhas) teores de TBT proporcionais aos teores dos solos onde cresceram. O uso de compostos organoestânicos em atividades agrícolas ainda é relatado por conta de sua ação fungicida, acaricidas e inseticida, é possível que o acúmulo do TBT nas folhas ou sua ação direta no solo iniba patógenos e herbívoros, beneficiando o crescimento das plantas (Novak & Trapp, 2005; Silva et al., 2014).

Nas presentes condições experimentais, *S. alterniflora* mostrou uma grande tolerância a contaminação dos solos com TBT, tendo sido exposta a concentrações desse contaminante semelhantes às encontradas na zona costeira brasileira e nos principais portos do país (e.g., máxima de TBT detectada de 888 ng TBT.g⁻¹ em Vitória-ES; Sant'anna et al., 2014). Assim é muito provável que no seu ambiente natural a grama não terá seu crescimento inibido pelos teores de TBT nos solos.

Novak & Trapp (2005) realizaram um bioensaio em condições de campo com 27 espécies de plantas superiores (a maioria halófitas), utilizando sedimentos dragados de um porto da Bélgica com concentrações de 1,6 x 10³ e 43 x 10³ ngTBT.g⁻¹. Após 6 meses de cultivo, os autores concluíram que a grande maioria das espécies não teve a produção de biomassa foliar afetada pela exposição as altas concentrações do TBT. Inclusive o sedimento com o maior teor de TBT, apesar de possuir outros contaminantes (metais e compostos orgânicos), apresentava característica mais lamosa e com maiores teores de nitrogênio e fósforo, que propiciaram uma maior produção de biomassa para o

sorgo *Sorghum bicolor* e a halófito de marismas *Phragmites australis* do que o sedimento com menor teor TBT (mais arenoso).

Efeitos letais e reduções marcadas do crescimento de plantas superiores induzidas pelo TBT foram observados somente em experimentos incluindo altíssimas concentrações desse contaminante. Silva et al. (2014) submetem o nabo *Brassica rapa* e o trigo comum *Triticum aestivum* a solos fortificados com 0 a 75×10^3 ngTBT.g⁻¹, avaliando o crescimento das hastes/caules e produção de biomassa foliar após 14 dias de cultivo. Estes autores estimaram para estas respostas biométricas das duas espécies os valores de menor concentração com efeito observável (“lowest observed effects concentration”; “LOEC”) e de metade da concentração máxima efetiva (“half maximal effective concentration”; “EC50”), respectivamente, entre $12,5-50 \times 10^3$ ngTBT.g⁻¹ e $11,8-52,8 \times 10^3$ ngTBT.g⁻¹. EC50 caracteriza a concentração do contaminante onde o máximo valor observado do parâmetro biométrico avaliado no organismo é reduzido à metade. Hund-Rinke & Simon (2004) realizaram bioensaios com TBT em solos com diferentes granulometrias e encontram valores de EC50 para produção de biomassa foliar entre $16-39 \times 10^3$ ngTBT.g⁻¹ para *B. rapa* e entre $452-687 \times 10^3$ ngTBT.g⁻¹ para a aveia *Avena sativa*. Todos os resultados acima suportam a hipótese de Novak & Trapp (2005) que, o TBT é essencialmente não tóxico para plantas superiores, sendo pouco provável a detecção de efeitos tóxicos em concentrações no solo menores do que 10×10^3 ngTBT.g⁻¹.

Espécies do gênero *Spartina* têm demonstrado alta tolerância a outros contaminantes orgânicos. *S. densiflora* cultivada por 30 dias em solo contaminado por fenatreno (Phe) com concentrações de 10 a 1000 mg Phe. Kg⁻¹, mostrou uma redução significativa no alongamento foliar e clorose em 1000 mg Phe. Kg⁻¹, entretanto não teve a sua taxa de crescimento relativo da biomassa afetada pelo contaminante (Redondo-Gómez et al., 2011). Plantas de *S. alterniflora* não demonstraram nenhuma inibição dos seus crescimentos quando pulverizadas com altas doses do fungicida Daconil, um clorotalonil do grupo das isoftalonitrila (Freitas et al., 2016; Sala et al., 2008; Silliman & Newell, 2003). Gomes Neto & Costa (2009) estimaram em 120 mg L⁻¹ de óleos e graxas a dose letal mediana (“median lethal concentration”; “LT50”) de *S. alterniflora* exposta por 30 dias a uma água de produção do petróleo, entretanto plantas desta espécie crescendo em diluições de 10-50% deste efluente produziram de 70-300% mais biomassa do que plantas no controle mantido em solução nutritiva sem o contaminante.

5.2 Efeitos remediadores da presença de plantas de *S. alterniflora* em solos contaminados com TBT

A halófita *S. alterniflora* favoreceu a degradação do tributíliestanho em solos contaminados. A presença desta planta resultou em uma degradação 196% maior dos butilestânicos no nível alto de contaminação de TBT do que em vasos controle não vegetados após 90 dias de crescimento. As reduções observadas em vasos com e sem plantas foram, respectivamente, de 72,05% e 25,35%. A gradual redução dos teores de TBT em solos sem a presença da *S. alterniflora* evidenciou que a degradação do composto ocorreu nas unidades experimentais independente da presença da planta nos primeiros 60 dias de cultivo, após os quais os teores mantiveram-se relativamente estáveis.

Nossos resultados experimentais sugerem que a remediação do TBT por *S. alterniflora* é dependente da quantidade total desse composto em contato com as raízes desta planta. O nível alto do contaminante não inibiu a formação de raízes, que mais facilmente tiveram contato com o TBT do que nos solos com nível baixo deste contaminante, promovendo sua redução no solo. Um aumento da concentração de TBT no solo implica em uma maior probabilidade de contato e interação das raízes com o contaminante. Novak & Trapp (2005) também observaram uma degradação do TBT induzida pelo plantio de cevada mais evidente em sedimentos dragados com alto teor inicial de butilestânicos ($43 \times 10^3 \text{ ngTBT.g}^{-1}$) do que em sedimentos com menores concentrações de TBT ($1,6 \times 10^3 \text{ ngTBT.g}^{-1}$). Esta planta conseguiu promover uma redução no TBT 40% maior do que de amostras em solo controle não vegetado após 6 meses de cultivo. Carvalho et al. (2010) avaliaram o efeito da presença da halófita *H. portulacoides* na remediação de solos contaminados com butilestânicos em laboratório e em uma marisma de Portugal. Em ambas as situações experimentais esta planta promoveu a redução dos butilestânicos, no entanto os melhores resultados foram obtidos em solos com altos teores de contaminantes (valores iniciais de $685 \text{ ng.TBT.g}^{-1}$, $1920 \text{ ng.DBT.g}^{-1}$ e $3570 \text{ ng.MBT.g}^{-1}$) em condições controladas de laboratório. Nesse bioensaio de laboratório foram quantificadas reduções de 75% do teor de TBT e de 78% do teor de DBT após 12 meses de cultivo nos vasos vegetados, em contraste com as reduções nos vasos não vegetados de 41% (TBT) e 48% (DBT). Os teores de MBT mostraram muito pouca variação neste experimento, inclusive com um pequeno aumento (5%) nos vasos vegetados. Avaliando níveis de contaminação bem menores de

TBT ($54,8$ à 137 ngTBT.g⁻¹), Lespes et al. (2009) observaram que apenas 15% do TBT introduzido no solo foi degradado após o cultivo de alface por 54 dias, concluindo que esta planta absorveu TBT lentamente principalmente nas suas raízes. Trabalhando com uma contaminação média inicial de 250 ngTBT.g⁻¹, Anderson et al. (2002) observaram um mesmo padrão de degradação do TBT no seus tratamentos vegetados com *S. alterniflora* e não vegetados ao longo de 16 meses, concluindo que esta planta não aumentava a degradação do TBT nas marismas. Além de uma possível baixa concentração para interação com raízes de *S. alterniflora*, a avaliação da degradação do TBT por Anderson et al. (2002) estava sujeita a uma grande interferência das marés, que podem promover a remoção de compostos orgânicos ou mesmo novos aportes de TBT a área experimental (Carvalho et al., 2010).

A rápida metabolização do TBT nos solos contaminados e o aumento das frações de DBT e MBT no bioensaio nos primeiros 60 dias sugerem um importante papel de microrganismos na degradação do TBT, durante este período de estabelecimento das plantas de *S. alterniflora* nos vasos. A bioadsorção do TBT por microrganismos pode ocorrer quase que instantaneamente quando células e butilestânho estão misturadas, sendo que este processo parece ser determinado por ligações físico-química desses compostos e a superfície celular, sem o requerimento de energia metabólica (Tam et al., 2002). 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 em laboratório. Estas bactérias frequentemente utilizam o TBT como fonte de carbono e degradam estes contaminantes, sendo esta a principal via de formação de seus metabólitos, como o DBT e MBT. Os processos mediados por microrganismos citados acima foram os possíveis determinantes da degradação do TBT nos solos sem plantas e no início do crescimento das *S. alterniflora* nos vasos.

A marcada redução dos níveis de DBT, MBT e organoestânicos totais nos últimos 30 dias de cultivo em solos vegetados por *S. alterniflora* e contaminados com o nível alto do TBT sugerem um aumento da capacidade de fitorremediação devido ao crescimento das plantas. Estas reduções foram concomitantes com uma redução significativa dos organoestânicos totais, e este padrão de resposta foi distinto dos vasos sem plantas, onde os teores de DBT, MBT e os organoestânicos totais permaneceram relativamente estáveis.

A absorção parcial de butilestânicos de solos contaminados pelas raízes das plantas e degradação no tecido vegetal têm sido observadas em várias plantas (Lespes et al., 2009; Novak & Trapp, 2005; Silva et al., 2014), embora este fato não foi experimentalmente confirmado para *S. alterniflora* no presente estudo. A ação de microrganismos, cujo crescimento pode ser estimulado pela rizosfera das plantas (Carvalho et al., 2010; Sakultantimetha et al., 2010), pode também ser responsável pela redução final dos butilestânicos. Carvalho et al. (2010) mostrou que a presença da halófitas *H. portulacoides* pode aumentar o número de bactérias no solo em até 160% em relação a solos não vegetados, sendo que parte destes microrganismos muito provavelmente tem papel degradador do TBT. Avaliações da absorção dos butilestânicos por *S. alterniflora* e quantificações da flora microbiana associada às raízes desta espécie são necessários para esclarecer os processos determinantes da remediação do TBT em altos teores deste contaminante.

6. Conclusão

A *S. alterniflora* demonstrou uma alta tolerância à contaminação sedimentar por TBT, com as plantas em solos contaminados apresentando apenas uma redução da renovação foliar das hastes mãe, entretanto tal efeito não afetou o desenvolvimento foliar e nem de biomassa da espécie em solo contaminado por TBT. Dentro das condições experimentais a *S. alterniflora* foi capaz de remediar teores significativos de TBT do solo contaminado. O bioensaio apontou que existe uma possibilidade de dependência do efeito remediador pela presença da planta e da concentração do contaminante no solo, com uma maior a probabilidade de contato com a rizosfera e degradação ocorrendo em altos teores do contaminante. *S. alterniflora* mostrou capacidade de se desenvolver sobre as condições de contaminação testadas e de fitorremediar solos com altos teores de TBT.

Condições ideais de desenvolvimento para *S. alterniflora* foram mantidas durante o experimento, sendo recomendados novos estudos da avaliação da toxicidade frente aos estresses ambientais verificados na zona costeira, como altas salinidades e alagamento periódico, bem como variação granulométrica, da matéria orgânica no sedimento e a presença de outros contaminantes que podem interagir com o sistema planta-TBT.

É de extrema importância a quantificação dos teores de TBT e seus metabolitos na biomassa foliar e de raízes das plantas em solos contaminados. A ocorrência dos processos de hiperacumulação e de fitodegradação do TBT nos tecidos da *S. alterniflora*, com a formação de seus metabólitos, deve ser também investigada. A ação de microrganismos certamente é determinante da degradação do TBT em solos e as plantas de *S. alterniflora* poderiam estimular estes organismos ao modificarem as condições físico-químicas do solo ou exsudarem compostos orgânicos pelas raízes. Compreender de maneira integrada todo o sistema planta-solo se faz necessário para a aplicação da *S. alterniflora* como ferramenta fitorremediadora do TBT, complementando projetos biotecnológico de remediação de solos contaminado por butilestânicos de maneira consistente e efetiva.

7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, CMR, AC DIAS, AP MUCHA, AA BORDALO & MTSD VASCONCELOS. 2009. Study of the influence of different organic pollutants on Cu accumulation by *Halimione portulacoides*. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, v. 85, n. 4, p. 627–632.

ALMEIDA, CMR, N COUTO, H RIBEIRO, AP MUCHA, A BORDALO, MC BASTO & MTSD VASCONCELOS. 2015. Salt marsh plant's potencialfor the remediationof hydrocarbon contaminated environments. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*. v. 1, p.3323-331.

ANDERSON, BA, MA UNGER & KA MOORE. 2002 Fate of tributyltin in a created tidal wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 21, n. 6, p. 1176–1183, 2002.

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

ALZIEU, CL, J SANJUAN, JP DELTREIL & M BOREL. 1986. Tin Contamination in 291 Arcachon Bay: Effects on Oyster Shell Aammalies. *Marine Pollution Bulletin*, v. 17, n. 1, p. 494-498.

ALZIEU, CL. 2000. Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. *Ecotoxicology*, v. 9, p. 71-76.

AZEVEDO, A, CBS COSTA, CS LEAL & JC MARANGONI. 2016. Efeitos da densidade de plantio e da adição de nutrientes na produção de mudas de gramas halófitas em recipientes. *Revista Ceres*, v. 63, n.1, p. 076–085.

CANARY, ACCM. 2007. Potencial poluidor da carcinocultura sobre meio ambiente aquático e suas alternativas de tratamento de efluentes. 90 f. Dissertação de Mestrado (PPG Aquicultura). Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS.

CARVALHO, NP, MCP BASTO, MFGM SILVA, A MACHADO, AA BORDALO & MTSD VASCONCELOS. 2010. Ability of salt marsh plants for TBT remediation in sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, n. 6, p. 1279–1286.

CASTRO, IB, L RODRIGUES-QUEIROZ & CDA ROCHA-BARREIRA. 2007. Organotin compounds: effects on the marine fauna – a review. *Arquivo de Ciências do Mar*, v. 40, n. 1, p. 96–112.

CASTRO, IB & G FILLMANN. 2012. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, n. 5, p. 955–960.

CASTRO, IB, PG COSTA, & G FILLMANN. 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: julho 2015.

COSTA, CSB & AJ DAVY. 1992. Coastal salt marsh communities of Latin America. In: *Coastal plant communities of Latin America* (Seeliger, U.; Ed.). Academic Press, San Diego, p.179-199.

COSTA, CSB, OO IRIBARNE & M FARINAJ. Human impacts and threats to the conservation of South American salt marshes. In: *Salt Marshes Under Global Siege* (Silliman, B.R., Grosholtz, T. & Bertness, M. D.; Eds.). University of California Press, Berkeley, cap. 17, p.337-359, 2009.

COSTA, CSB & O HERRERA. Halophytic life in Brazilian salt flats: biodiversity, uses and threats. In: Sabkha Ecosystems: The Americas (M. Ajmal Khan, Benno Böer, Miguel Clüsener-Godt, MunirÖztürk and Bilquees Gul, Eds.). Springer, Netherlands, v.5, 2016.

DU, J, S CHADALAVADA, Z CHEN & R NAIDU. 2014. Environmental remediation techniques of tributyltin contamination in soil and water: A review. Chemical Engineering Journal, v. 235, p. 141–150.

FAO. 2014 The State of World's Fisheries and Aquaculture. Opportunities and Challenges. Rome, p.78.

FRANCOIS, R, FT SHORT & JH WEBER. 1989. Accumulation and persistence of tributyltin in eelgrass (*Zostera marina* L.) tissue. Environmental Science and Technology, v. 23, n. 2, p. 191–196.

FREITAS, RF, EC SCHRACK, Q HE, BR SILLIMAN, EB FURLONG, AC TELLES & CSB COSTA. 2016. Consumer control of the establishment of marsh foundation plants in intertidal mudflats. Marine Ecology Progress Series, v. 547, p. 79–89, 7 abr.

GODOI, AFL, R FAVORETO & M SANTIAGO-SILVA. 2003. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. Química Nova, v. 26, n. 5, p. 708–716.

GRATÃO, PL, MNV PRASAD, PF CARDOSO, PJ LEA & RA AZEVEDO. 2005 Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. Brazilian Journal of Plant Physiology, v 17, p.53–64.

GRAY, JS. 1981. The Ecology of Marine Sediments, Cambridge University Press, New York, NY.

HUND-RINKE, K & M SIMON, M. Terrestrial Ecotoxicity of Eight Chemicals in a Systematic Approach. Journal of Soils and Sediments, v. 5, n. 1, p. 59–65, 2004.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - An overview. Applied Geochemistry, v. 16, n. 7–8, p. 719–743, 2001.

LACERDA, LD, JL FREIXO & SM COELHO. 1997. The effect of *Spartina alterniflora* Loisel on trace metals accumulation in inter-tidal sediments. Mangroves and Salt Marshes, v. 1, n. 4, p. 201–209.

LAHBIB Y, S ABIDLI, JF CHIFFOLEAU, B AVERTY & NTE MENIF. 2009. First record of butyltin body burden and imposex status in *Haxapllax trunculus* (L.) along the Tunisian coast. Journal of Environmental Monitoring, v. 11, p. 1253-1258.

LESPES, G, C MARCIC, J HEROULT, IL HECHO & L DENAIX. 2009. Tributyltin and triphenyltin uptake by lettuce. *Journal of Environmental Management*, v. 90, n. SUPPL. 1, p. 60–68.

LIN, Q, IA MENDELSSOHN, SA GRAHAM, A HOUB, JW FLEEGER & DR DEIS. Response of salt marshes to oiling from the Deepwater Horizon spill: Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability. *Science of The Total Environment*, v. 557, p. 369–377, 2016.

LYTLE, JS & TF LYTLE. 2001. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, v. 20, n. 1, p. 68–83.

MARANGONI JC & CSB COSTA. 2012. Short- and long-term vegetative propagation of two *Spartina* species on a salt marsh in southern Brazil. *Estuaries and Coasts*, v.35, p.763–773.

MEGGO, RE & JL SCHNOOR. 2013. Rhizosphere redox cycling and implications for rhizosphere biotransformation of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners. *Ecological Engineering*, v. 57, p. 285–292.

NETO, AG & CSB COSTA. 2009. Survival and growth of the dominant salt marsh grass *Spartina alterniflora* in an oil industry saline wastewater. *International Journal of Phytoremediation*, v. 11, n. 7, p. 640–650.

NOVAK, J & S TRAPP. 2005. Growth of plants on TBT-contaminated harbour sludge and effect on TBT removal. *Environmental science and pollution research international*, v. 12, n. 6, p. 332–41.

PADGETT, DE & JL BROWN.1999. Effects of drainage and soil organic content on growth of *Spartina alterniflora* (Poaceae) in an artificial salt marsh mesocosm. *American journal of botany*, v. 86, n. 5, p. 697–702, maio.

PAZ-VILLRAGA CA, IB CASTRO, P MILOSLAVICH & G FILLMANN. 2015. Venezuelan Caribbean Sea under the threat of TBT. *Chemosphere*, v. 119, p. 704-710.

PEACHEY, RBJ. 2003 Tributyltin and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in Mobile Bay, Alabama: A review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, n. 11, p. 1365–1371.

QUINTAS, PY, AL OLIVA, A ARIAS, CE DOMINI, MB ALVAREZ, M GARRIDO & JE MARCOVECCHIO. 2016. Seasonal changes in organotin compounds in sediments from the Bahía Blanca Estuary. *Environmental Earth Sciences*, v. 75, n. 8.

REDONDO-GÓMEZ, S, LANDRADES-MORENO, R PARRA, J VALERA-BURGOS, M REAL, E MATEOS-NARANJO, L COX & J CORNEJO. 2011. *Spartina densiflora* demonstrates high tolerance to phenanthrene in soil and reduces its concentration. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 8, p. 1800–1808, 2011.

RUDEL. H., 2003 Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56, p. 180–189.

SAKULTANTIMETHA, A, HE KEENAN, TK BEATTIE, TJ ASPRAY & A SONGSEASEN. 2010. Acceleration of tributyltin biodegradation by sediment microorganisms under optimized environmental conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 6, p. 467–473.

SALA, NM., MD BERTNESS & BR SILLIMAN. 2008. The dynamics of bottom-up and top-down control in a New England salt marsh. *Oikos*, v. 117, n. 7, p. 1050–1056.

SANT'ANNA, BS, DM SANTOS, MRR MARCHI, FJ ZARA & A TURRA. 2012. Effects of tributyltin exposure in hermit crabs: *Clibanarius vittatus* as a model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 632–638.

SANT'ANNA, BS, DM SANTOS, MRR MARCHI, FJ ZARA & A TURRA. 2014. Surface-sediment and hermit-crab contamination by butyltins in southeastern Atlantic estuaries after ban of TBT-based antifouling paints. *Environmental Science Pollution Research*, v. 21, p. 6516-6524.

SANTOS, DM, BS SANT'ANNA, AFL GODOI, A TURRA & MRR MARCHI. 2011. Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. Nova Science Publishers, n. JANUARY, p. 31–59.

SANTOS, DM, A TURRA, MRR MARCHI & RC MONTE. 2016. Distribution of butyltin compounds in Brazil's southern and southeastern estuarine ecosystems: assessment of spatial scale and compartments. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 16152 – 16163.

SILLIMAN, BR & SY NEWELL. Fungal farming in a snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 26, p. 15643–8, 23 dez. 2003.

SILVA, PV, ARR SILVA, S MENDO & S LOUREIRO. 2014. Toxicity of tributyltin (TBT) to terrestrial organisms and its species sensitivity distribution. *Science of the Total Environment*, v. 466, p. 1037–1046.

SIMON, S, M BUENO, G LESPES, M MENCH & M POTIN-GAUTIER. 2002. Extraction procedure for organotin analysis in plant matrices: optimisation and application. *Talanta*, v. 57, n. 1, p. 31–43.

SOUSA, WTZ. 2003. Tratamento de efluentes de carcinocultura por dois wetlands artificiais pilotos, com e sem *Spartina alterniflora* - perspectivas de aplicação. 92 f. Dissertação de Mestrado (PPG Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC.

SOUSA, WTZ, CMN PANITZ & SM THOMAZ. 2011. Performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands with and without the emergent macrophyte *Spartina alterniflora* treating mariculture effluent. *Braz. arch. biol. Technol.*, 54(2): 405-413.

SUGUIO, K. 1973. Introdução à sedimentologia, cap. 8, São Paulo.

TAM, NFY, AMY CHONG & YS WONG. 2002. Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Marine Pollution Bulletin*, v. 45, n. 1–12, p. 362–371.

USEPA. 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. Washington, U.S. Environmental Protection Agency.

VIANA, F, TMB CORREIA, MI MACHADO, NP ZANELA, EM PEDERZOLLI, PRM BAISCH & CSB COSTA. 2008. O uso da fitorremediação em área contaminada por resíduos da indústria petroquímica. *Petro e Química*, n. 310: p. 52-56.

WALMSLEY, S. 2002. FND0539998, Tributyltin pollution on global scale. An overview of relevant and recent research: impacts and issues. Marine Biological Association, Plymouth, UK.

ANEXO I

Tabelas Suplementares

Tabela S1: Resultados das Análises de Variância das alturas, números de folhas vivas (NFV) (A) e folhas mortas (NFM) (B) das hastes mãe de *Spartina alterniflora*, bem como de biomassas de folhas, biomassa de raízes (C) e percentual de alocação de biomassa para folhas (D) entre diferentes concentrações de TBT ao longo dos 90 dias do experimento.

(A)

| FATORES (\$) | ALTURA | | | | NFV | | |
|--------------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p |
| TEMPO | 2 | 1,660 | 88,216 | <0,001 | 6,533 | 5,026 | 0,005 |
| TBT | 2 | 0,181 | 3,294 | 0,072 | 0,133 | 0,049 | 0,953 |
| TEMPO*TBT | 4 | 0,009 | 0,230 | 0,919 | 0,533 | 0,205 | 0,933 |
| RESÍDUO | 24 | 0,226 | | | | | |

(B)

| FATORES (#) | NFM | | | |
|-------------|-----|--------|-------|-------|
| | GL | SQ | F | p |
| TBT | 2 | 1,200 | 0,643 | 0,543 |
| RESÍDUO | 12 | 11,200 | | |

(C)

| BIOMASSA SECA | | | | | | | |
|---------------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|
| FATORES (&) | FOLIAR | | | | RAÍZ | | |
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p |
| TEMPO | 1 | 2310243 | 39,190 | <0,001 | 7323,64 | 129,565 | <0,001 |
| TBT | 1 | 234745 | 1,991 | 0,158 | 2515,11 | 22,248 | <0,001 |
| TEMPO*TBT | 2 | 202232 | 1,715 | 0,201 | 2368,62 | 20,952 | <0,001 |
| RESÍDUO | 24 | 1414809 | | | 1356,60 | | |

(D)

| FATORES (&) | Alocação para Biomassa Foliar (%) | | | |
|-------------|-----------------------------------|---------|--------|--------|
| | GL | SQ | F | p |
| TEMPO | 1 | 4239,11 | 69,001 | <0,001 |
| TBT | 2 | 1353,22 | 22,027 | <0,001 |
| TEMPO*TBT | 2 | 691,55 | 11,257 | <0,001 |
| RESÍDUO | 24 | 2715,75 | | |

*Os símbolos na tabela representam a análise de variância utilizada nos dados: (\$) medidas repetidas, (#) unifatorial e (&) bifatorial.

Tabela S2: Resultados das Análises de Variância das concentrações de TBT, DBT e MBT entre datas cultivo (0-90 dias) nos solos fortificados com o nível baixo (A) e alto (B) de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*.

(A)

| FATORES | TBT | | | | DBT | | | MBT | | |
|----------------------------|-----|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Com <i>S. alterniflora</i> | | | | | | | | | | |
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p | SQ | F | p |
| TEMPO | 2 | 0,107 | 2,508 | 0,162 | 601,51 | 0,713 | 0,527 | 2,578 | 7,611 | 0,023 |
| RESÍDUO | 6 | 0,043 | | | 843,59 | | | 0,339 | | |
| Sem <i>S. alterniflora</i> | | | | | | | | | | |
| TEMPO | 2 | 0,117 | 6,939 | 0,028 | 305,41 | 1,092 | 0,394 | 1,983 | 5,560 | 0,0229 |
| RESÍDUO | 6 | 0,017 | | | 279,67 | | | 0,262 | | |

B)

| FATORES | TBT | | | | DBT | | | MBT | | |
|----------------------------|-----|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Com <i>S. alterniflora</i> | | | | | | | | | | |
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p | SQ | F | p |
| TEMPO | 2 | 0,460 | 13,346 | 0,006 | 428,2 | 6,610 | 0,030 | 1,213 | 3,500 | 0,098 |
| RESÍDUO | 6 | 0,035 | | | 647,2 | | | 0,347 | | |
| Sem <i>S. alterniflora</i> | | | | | | | | | | |
| TEMPO | 2 | 0,118 | 4,898 | 0,054 | 1405,1 | 1,823 | 0,241 | 0,367 | 7,173 | 0,026 |
| RESÍDUO | 6 | 0,024 | | | 770,5 | | | 0,051 | | |

Tabela S3: Resultados das Análises de Variância das concentrações dos organoestânicos totais (ng.SN.g⁻¹) ao longo dos 90 dias de cultivo, nos solos fortificados com os dois níveis de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*.

| OTs | | | | | | | |
|------------|-------------|---------|-------|-------|------------|--------|-------|
| Fator | Nível baixo | | | | Nível alto | | |
| Com planta | | | | | | | |
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p |
| Tempo | 2 | 161,19 | 0,080 | 0,924 | 60311,5 | 11,749 | 0,008 |
| Resíduo | 6 | 2011,51 | | | 5133,3 | | |
| Sem planta | | | | | | | |
| Tempo | 2 | 728,97 | 3,685 | 0,090 | 7465,8 | 0,509 | 0,625 |
| Resíduo | 6 | 197,82 | | | 14670,3 | | |

Tabela S4: Resultados das Análises de Variância das concentrações de TBT e do percentual de carbono orgânico (A), dos teores de DBT, MBT (B) nos solos fortificados com dois níveis de TBT, com e sem a presença de plantas de *S. alterniflora*, coletados aos 60 e 90 dias do experimento.

(A)

| FATORES | TBT | | | | C (%) | | |
|--------------|-----|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p |
| TEMPO | 1 | 0,295 | 7,416 | 0,014 | 0,04 | 1,409 | 0,253 |
| TRT | 1 | 1,670 | 42,034 | 0,000 | 0,10 | 3,721 | 0,072 |
| PLANTA | 1 | 0,005 | 0,120 | 0,733 | 0,01 | 0,260 | 0,617 |
| TEMPO*TRT | 1 | 0,077 | 1,938 | 0,182 | 0,06 | 2,298 | 0,149 |
| TEMPO*PLANTA | 1 | 0,215 | 5,409 | 0,033 | 0,06 | 2,188 | 0,159 |
| TRT*PLANTA | 1 | 0,148 | 3,724 | 0,071 | 0,00 | 0,007 | 0,932 |
| RESÍDUO | 17 | 0,040 | | | 0,03 | | |

B)

| FATORES | DBT | | | | MBT | | |
|--------------|-----|---------|--------|-------|------|-------|-------|
| | GL | SQ | F | p | SQ | F | p |
| TEMPO | 1 | 5456,2 | 5,962 | 0,026 | 0,00 | 0,001 | 0,982 |
| TRT | 1 | 41455,5 | 45,301 | 0,000 | 2,34 | 5,912 | 0,026 |
| PLANTA | 1 | 880,3 | 0,962 | 0,340 | 0,34 | 0,853 | 0,369 |
| TEMPO*TRT | 1 | 745,2 | 0,814 | 0,379 | 2,57 | 6,509 | 0,021 |
| TEMPO*PLANTA | 1 | 2352,6 | 2,571 | 0,127 | 0,45 | 1,137 | 0,301 |
| TRT*PLANTA | 1 | 1285,8 | 1,405 | 0,252 | 0,95 | 2,396 | 0,140 |
| RESÍDUO | 17 | 915,1 | | | 0,40 | | |