

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

CECÍLIA SIMON DA SILVA

**INDUÇÃO DE IMPOSEX EM *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791) (MOLLUSCA:
GASTROPODA: FASCIOLARIIDAE) SUBMETIDA À ÁGUA CONTAMINADA COM
TRIBUTILESTANHO (TBT)**

VITÓRIA

2013

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

CECÍLIA SIMON DA SILVA

**INDUÇÃO DE IMPOSEX EM *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791) (MOLLUSCA:
GASTROPODA: FASCIOLARIIDAE) SUBMETIDA À ÁGUA CONTAMINADA COM
TRIBUTILESTANHO (TBT)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof^o Msc. Marcelo Paes Gomes.

Co-orientador: Prof^a Dra. Mercia Barcellos da Costa

VITÓRIA

2013

CECÍLIA SIMON DA SILVA

**INDUÇÃO DE IMPOSEX EM *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791) (MOLLUSCA:
GASTROPODA: FASCIOLARIIDAE) SUBMETIDA À ÁGUA CONTAMINADA COM
TRIBUTILESTANHO (TBT)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana de Vitória, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em _____ de _____ de _____, por:

Prof. MSc. Marcelo Paes Gomes, FCSES – Orientador

Prof. MSc. Danilo Camargo Santos, FCSES

Profª Drª Fernanda Tonini Gobbi, FCSES

À Vânia Simon, minha mãe, pela qual eu
tenho a mais sincera admiração.

Seguindo sua felicidade, o mundo abrirá portas
para você onde antes só haviam paredes.

Joseph Campbell

AGRADECIMENTOS

À chefe Mercia, pela oportunidade, orientação, colaboração, paciência e apoio para a realização desse trabalho, dedico um capítulo inteiro de gratidão, daqueles bem grandes, tipo referencial teórico com mais de vinte páginas, por todo o conhecimento passado, e ter me aberto as portas para uma nova paixão.

Ao co-orientador e advogado do diabo, Marcelo, por ter me aguentado em momentos de desespero, pelos bons conselhos, puxões de orelha, risadas e muitas, muitas lágrimas.

À Gabi agradeço pela atenção, companhia, paciência e dedicação em me ensinar estatística.

À desvirtuadora de pensamentos botânicos, Marcella, dedico bem mais do que palavras que representem agradecimentos, mas sim à existência desse trabalho. No fim, obrigada por não ter me deixado dormir às tardes.

À Selma, que me fez ter um coração de tricomas estrelados, me abraçou como filha, me incentivou e esteve ao meu lado, mesmo quando o vínculo botânico não era mais tão forte.

Aos amigos da Faculdade, Fred, Pâmela, Rayani, Rudá, ofereço um bom capítulo desta monografia, repleto de palavras de carinho, força e apoio. Sem eles minha caminhada pela Ciências Biológicas seria menos alegre.

Aos amigos do Laboratório de Malacologia, Bruno, Marcella, Karina, Gabriel, Tayná-nã de porta e aos recém chegados Heitor, Ludmilla e Milena, que representam muitos parágrafos de contribuição, agradeço por dedicarem tempo e ajuda em campo, cuidado parental com os gastrópodes, e nas análises.

Aos amigos biólogos, Luiz e Bruno, pelo auxílio na execução desse trabalho.

Ao professor Luiz Fernando e ao Laboratório de Malacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, pela disponibilização de espaço, materiais e condições para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Danilo, pela atenção, disponibilidade e boa vontade em socorrer aos 45 minutos do segundo tempo.

À Professora Fernanda, pelas palavras de ânimo e por me fazer entender o fundamento das minhas exigências.

À primeira pessoa a me falar sobre a carreira de um biólogo, a professora Marcelle Vidal, e ao meu Tio Rafael, pela inestimável força à segui-la.

Agradeço também ao grande objeto de estudo dessa pesquisa, a *Leucozonia nassa*. Sinto muito pelo estresse e vidas retiradas. Vocês serão lembradas eternamente.

E às pessoas mais importantes da minha vida, mãe, padrasto, irmão e avó, ofereço esta obra inteira, sem tirar uma vírgula. Registro minha imensa gratidão por estarem sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso.

RESUMO

O Tributilestanho (TBT) é um composto organoestânico (COE) aplicado em tintas anti-incrustantes para evitar a adesão de organismos sobre superfícies submersas. É considerado ameaça para a vida marinha, em função da sua elevada persistência no ambiente, capacidade de transferência na cadeia trófica, e por abordar multicompartimentos e multitoxicidade. Em gastrópodes, o TBT possibilita o desenvolvimento de imposex, síndrome irreversível responsável pelo aparecimento de caracteres sexuais masculinos em indivíduos do sexo feminino. A intensidade do imposex está diretamente relacionada às concentrações de TBT, ao tempo de exposição ao contaminante e à maturidade sexual dos organismos afetados. O presente estudo teve por objetivo verificar o desenvolvimento de imposex via água contaminada por TBT à $5 \mu\text{g TBTL}^{-1}$ em jovens e adultos do neogastrópode marinho *Leucozonia nassa*, em função do tempo de exposição. Os exemplares foram coletados em períodos de baixa-mar, em maio de 2013 em 3 regiões livres de contaminação por COE's: Praias de Coqueiral, Santa Cruz e Final da Praia de Jacaraípe. Exemplares de *L. nassa* após serem narcotizados em solução de MgCl_2 4,0%, foram sexados, e os machos devolvidos aos locais de coleta. As fêmeas foram separadas em classes de tamanho e distribuídas em aquários para a indução. A cada quinzena, 10 animais eram desconchados para análise dos índices de imposex utilizando o percentual de imposex (I%), índice da sequência do vaso deferente (VDSI) e o comprimento do pênis da fêmea (CPF). Os resultados indicaram diferença na sensibilidade de adultos em relação à juvenis de *L. nassa*, uma vez que com 15 dias de tratamento os juvenis apresentaram alterações morfológicas decorrentes da síndrome. Os períodos de análise de 15, 30, 45 e 60 dias não apresentaram diferença significativa para o VDSI, bem como a idade em relação ao CPF ($p > 0,05$). Houveram diferenças significativas atribuídas ao VDSI em relação ao estágio de vida ($p = 0,02$) e quanto ao CPF para os períodos de análise ($p = 0,01$).

Palavras-chave: Imposex. Tributilestanho. Biomonitoramento. *Leucozonia nassa*.

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an organotin compound (COE) applied in antifouling paints to avoid adhesion of marine organism in submerge surfaces. It is consider a threat to marine life due to their high persistence in the environment, capacity of transference to high trophic levels and approach multicompartments and multitoxicity. In gastropods, TBT causes imposex, an irreversible syndrome responsible for appearance of male sexual characteristics develop in females. The intensity of this syndrome is directly related to TBT concentrations, exposition period to contaminant and to sexual maturity of affected organisms. This study aimed to verify the development of imposex in contaminated water by TBT in $5 \mu\text{g TBTL}^{-1}$ in young and adults of marine neogastropod *Leucozonia nassa*, depending on the exposure time. The samples were collected during low tide periods in May 2013 in 3 regions free of COE's contamination: Coqueiral Beach, Santa Cruz and End of Jacaraípe's Beach. After narcotization with MgCl_2 4.0% solution the specims of *Leucozonia nassa* were sexed and the males replaced to sample stations. The females were separated into size classes and distributed in aquariums for imposex induction. Each 15 day-period, 10 animals were analysed by imposex indices using the percentage of imposex (% I), vas deferent sequence index (VDSI) and the female penis length (CPF). The results indicate difference in sensitivity of *L. nassaa* dults compared to juvenile, once with 15 days of treatment juveniles showed morphologic alterations of the syndrome. The analysis periods of 15, 30, 45 and 60 days showed no significant difference for VDSI and age in relation to the CPF ($p > .05$). There were significant differences attributed to VDSI in relation to life stage ($p = 0.02$) and on the CPF for the periods ($p = 0.01$).

Keywords: Imposex. Tributyltin. Biomonitoring. *Leucozonia nassa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos Organoestânicos (COE's)	30
Figura 2 - Estrutura química do TBT+, (C ₄ H ₉) ₃ Sn+	31
Figura 3 - Processo de auto-polimento do copolímero à base de TBT	33
Figura 4 - Escala VDSI proposto por Gibbs e outros (1987) para a espécie <i>N. lapillus</i> . td: tentáculo direito; a: ânus; vd: vaso deferente; pg: papila genital; gc: glândula da cápsula; p: papila; r: reto; ca: cápsulas ovígeras	42
Figura 5 - Desenvolvimento de imposex. Ac: cápsulas abortadas; cg: glândula da cápsula; gp: papila genital; obc: bursa copulatrix aberta; ocg: glândula da cápsula aberta; ocv: oclusão da vulva; p: pênis; pd: ducto penial; pr: próstata; te: tentáculo; vd: vaso deferente; vpd: passagem do vaso deferente pela glândula da cápsula; vds: secção do vaso deferente	43
Figura 6 - Animais da espécie <i>L. nassa</i> . A) Fêmea normal, B) Macho e C) Fêmea imposexada. GC : Glândula da cápsula; v: vulva; P: Pênis; VD: Vaso deferente	47
Figura 7 - Localização das estações de amostragem ao longo do litoral centro-norte do Espírito Santo. (1) Praia de Jacaraípe. (2) Praia de Santa Cruz. (3) Praia de Coqueiral	53
Figura 8 - Exemplar de <i>Leucozonia nassa</i>	55
Figura 9 - Processos iniciais de separação dos organismos quanto ao sexo e classe de tamanho. A) Procedimento de puxamento do opérculo de <i>Leucozonia nassa</i> para determinação do sexo. B) Medidas morfométricas da concha	58
Figura 10 – Aquários utilizados no processo de indução laboratorial de imposex em <i>L. nassa</i> no presente estudo	59
Figura 11 – Procedimento de contaminação da água dos aquários a partir da adição de 2 ml de TBT da concentração mãe	60
Figura 12 - Procedimentos prévios à análise de imposex. A) Imersão dos exemplares de <i>L. nassa</i> em substância anestésica para narcotização. B) Quebra da concha com morsa para exibição das partes moles do animal. C) Animal desconchado para diagnóstico de imposex	61

Figura 13 - Procedimentos de análise de imposex. A) Abertura da cavidade palial. B) Inserção de alfinete entomológico no poro gonodal. C) Realização da medida do comprimento do pênis de <i>L. nassa</i>	62
Figura 14 - Exemplar adulto desconchado de <i>Leucozonia nassa</i> não imposexado analisado ao 60 ^o dia do experimento. gc: glândula de cápsula; v: vulva.....	71
Figura 15 - Exemplar adulto imposexado de <i>Leucozonia nassa</i> com pênis de 14,3 mm e VD estágio 3 analisado ao 45 ^o dia de experimento. gc: Glândula de cápsula; v: Vulva; vd: Vaso deferente; p: Pênis	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores encontrados para a razão sexual em uma população de <i>Leucozonia nassa</i> coletada em áreas de referência	63
Gráfico 2 – Diferenças no número de fêmeas de <i>Leucozonia nassa</i> coletadas em relação à classe de tamanho	64
Gráfico 3 - Percentagem de imposex (I%) e valores médios de VDSI obtidos para fêmeas adultas de <i>Leucozonia nassa</i> em relação ao tempo de exposição ao contaminante	68
Gráfico 4 - Percentagem de imposex (I%) e valores médios de VDSI obtidos para fêmeas juvenis de <i>Leucozonia nassa</i> em relação ao tempo de exposição ao contaminante	69
Gráfico 5 – Média da percentagem de fêmeas adultas e juvenis imposexadas ao final do experimento	70
Gráfico 6 – Valores médios (\pm desvio padrão) do desenvolvimento do vaso deferente (VDSI) em relação ao estágio de vida (juvenil e adulto) dos espécimes de <i>Leucozonia nassa</i> ($p=0,02$)	72
Gráfico 7 – Valores médios (\pm Desvio Padrão) para desenvolvimento de vaso deferente em fêmea imposexada de <i>Leucozonia nassa</i> em relação aos períodos de análise de contaminação	73
Gráfico 8 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) para comprimento do pênis (mm) da fêmea imposexada de <i>Leucozonia nassa</i> em relação ao estágio de maturação	75
Gráfico 9 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) para comprimento do pênis (mm) das fêmeas imposexadas de <i>Leucozonia nassa</i> ao longo dos períodos de análise	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As gerações de tintas anti-incrustantes	31
Tabela 2 - Efeitos do TBT sobre a embriogênese e desenvolvimento de larvas de <i>Crassostrea gigas</i>	35
Tabela 3 - Táxons animais afetados por organoestânicos	36
Tabela 04 - Taxa de mortalidade dos exemplares de <i>Leucozonia nassa</i> ao longo dos períodos de análise	66
Tabela 5 – Classe de tamanho e quantificação de exemplares e valores de I%, CPF, VDSI para <i>Leucozonia nassa</i> analisados ao longo dos períodos de experimentação. I%: índices de imposex. CPF: comprimento do pênis da fêmea. VDSI: Sequência de desenvolvimento do vaso deferente	67
Tabela 6 - Resultados do teste de Kruskal-Walis utilizando o índice de VDSI e CPF entre os períodos de análise e a idade de <i>Leucozonia nassa</i> . p: probabilidade associada ao valor do teste	72

LISTA DE SIGLAS

COE's - Compostos orgânicos de estanho

TBT - Tributilestanho

TPT - Trifenilestanho

MBT - Monobutil-estanho

TPhT -Trifenilestanho

DPhT - Difenilestanho

MPhT - Monofenil-estanho

TBTF - TBT-Fluoreto

IMO - *International Marine Organization* (Organização Marítima Internacional)

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

AFS – *Anti-fouling System Convention* (Convenção de Sistemas Anti-fouling)

ISI - Índice de intersex

I% - Porcentagem de incidência de imposex

VDSI - *Vas deferens sequence index* (Índice de sequência do vaso deferente)

RPLI - *Relative penis length index* (Índice de comprimento relativo do pênis)

RPSI - *Relative penis size index* (Índice de tamanho relativo do pênis)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REFERENCIAL TEÓRICO	29
2.1 BREVE HISTÓRICO E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO	29
2.2 ANTI-INCRUSTANTES ORGANOESTÂNICOS NO AMBIENTE MARINHO	33
2.3 EFEITOS DO TBT SOBRE ORGANISMOS MARINHOS	35
2.4 CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO E A SAÚDE HUMANA	38
2.5 LEGISLAÇÃO	40
2.6 ESCALAS DE QUANTIFICAÇÃO DE IMPOSEX	41
2.7 A IMPORTÂNCIA DA APLICAÇÃO DE INVERTEBRADOS EM PROGRAMAS DE BIOMONITORAMENTO	44
2.8 ESTRATÉGIAS DE MONITORAMENTO NO AMBIENTE	45
2.8.1 Monitoramento Biológico	46
2.8.1.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando Balling	46
2.8.1.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Imposex	46
2.8.1.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Intersex	48
2.8.2 Monitoramento Químico	49
2.8.2.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando Água	50
2.8.2.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Sedimento	51
2.8.2.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Material Biológico	51
3 METODOLOGIA	53
3.1 ÁREA DE ESTUDO	53
3.2 ESCOLHA E DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	55
3.3 COLETA DOS ESPÉCIMES	57
3.4 DETERMINAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL	58
3.5 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS	58
3.5.1 Sexagem e medidas morfométricas	58
3.5.2 Aclimação	60

3.5.3 Utilização do TBT	60
3.5.4 Manutenção de Aquários	61
3.5.5 Anestesia e remoção de conchas	62
3.5.6 Análise de imposex	62
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 RAZÃO SEXUAL	65
4.2 TAXA DE MORTALIDADE	66
4.3 ÍNDICE DE IMPOSEX E VDSI	69
4.4 COMPRIMENTO DO PÊNIS	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6 REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A contaminação marinha por poluentes químicos é decorrente da ação antrópica direta ou indireta sobre processos cíclicos do ambiente, que interferem em modificações nos ecossistemas marinhos, e os tornam receptores temporários ou finais dessa poluição (MORAES et al., 2001; TOMMASI, 1977).

Com a decorrente expansão na colonização de regiões litorâneas, as cidades, indústrias, atividades náuticas e estaleiros ampliaram-se para a manutenção do comércio marítimo, gerando aumento das concentrações de poluentes em sistemas semi fechados, tais como portos, marinas e estuários, resultando em pressões sobre os ecossistemas marinhos. (FERNANDEZ, 2004; CHAMP, 2000; TURNER, 2010). As fontes não pontuais de poluição são em geral oriundas da mistura de resíduos de atividades comerciais, industriais, residenciais, agrícolas e recreacionais (FLORY; ABER, 2005; CARPENTER et al., 1998) que originam compostos e substâncias químicas antropogênicas, resultando numa série de efeitos metabólicos adversos para organismos não alvos, assim como persistência e bioacumulação na cadeia alimentar (BAYNI; MARQUES, 2001; DAVIES; MCKIE, 1987).

O assentamento e aderência de organismos bioincrustantes (*fouling*) em superfícies expostas à água tem seu estabelecimento facilitado pela colonização inicial por micro-organismos e retenção de larvas de invertebrados nos substratos (CHAMP; PUGH, 1987; LEWIS, 1998, ZOBEL; ALLEN, 1935). Para evitar a fixação, diversos grupos de biocidas foram incorporados às formulações das tintas anti-incrustantes, que tiveram eficiência reconhecida globalmente (CASTRO; WESTPHAL, FILLMANN, 2011; CHAMP, 2000).

As tintas anti-incrustantes podem ser utilizadas em embarcações comerciais, de pesca e recreio, plataformas marinhas, redes, tubulações marinhas e demais estruturas que permaneçam longos períodos em contato com a água do mar, como sistema de proteção a fim de se reduzir a adesão por epizoários, como cirripédios, algas, mexilhões, vermes, antozoários, e outros invertebrados (KOTRIKLA, 2009; CHOI et al., 2013; BASHEER et al., 2002; YEBRA et al., 2004; OEHLMANN et al., 1998).

Apesar de serem altamente tóxicos, os compostos organoestânicos (COE's), tais como o Tributilestanho (TBT) e Trifenilestanho (TPT) apresentam múltiplas aplicações na indústria e agricultura, sendo empregados em sistemas de refrigeração de usinas, ou ainda como biocidas em tintas anti-incrustantes, pesticidas, fungicida, acaricida e produtores e estabilizadores de plásticos PVC (BACCI; GAGGI, 1989; OYEWO, 1989; BAUER et al., 1997; FERNANDEZ, 2002; CHAMP; PUGH, 1987, FENT, 1996, MENSINK et al., 1997).

Já foram constatados contaminações por COE's em uma grande variedade de organismos não alvos, como peixes (FENT, 1996), fanerógamas marinhas (JENSEN et al., 2004), cetáceos (CARBALLO et al., 2004) e em seres humanos (FERNANDEZ et al., 2005).

Em gastrópodes, o TBT pode causar síndromes como imposex, intersex e ovo-testis (MORCILLO; PORTE, 1998; OEHLMANN *et al.*, 1998). Trabalhos em campo e estudos laboratoriais tem demonstrado forte correlação entre o imposex e o uso de TBT em tintas anti-*fouling* (GIBBS; BRYAN; PASCOE, 1991).

O imposex é uma síndrome irreversível caracterizada pela imposição de características sexuais masculinas, com o desenvolvimento de pênis e vaso deferente, induzida por baixas concentrações de TBT, que resulta em interrupção hormonal, subsequente falência reprodutiva, morte dos organismos afetados, e a longo prazo, extinção local da espécie por falta de recrutamento (GIBBS et al., 1987; SANTOS, et al., 2011; GIBBS; BRYAN, 1987; OEHLMANN et al., 1998).

Em 1987, Gibbs e Bryan descreveram o imposex em *Nucella lapillus* coletada na Inglaterra e, posteriormente, a síndrome foi observada em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (MAGALHÃES et al., 1997).

Devido aos efeitos prejudiciais que os compostos organoestânicos tem causado a organismos aquáticos, uma variedade de métodos tem sido desenvolvida para determinar sua ocorrência em várias matrizes, incluindo água (STROBEN, et al., 1992), sedimentos (AXIAK et al., 1995) e tecidos da biota (GIBBS et al., 1990; MORCILLO; PORTE, 1998).

Em função da elevada toxicidade, a Organização Marítima Internacional (IMO) recomendou a proibição global da utilização de COE's a partir de janeiro de 2003 e o

banimento completo da aplicação destes compostos em embarcações foi efetivado em janeiro de 2008 (CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012).

Apesar da proibição total em 2008, concentrações elevadas de TBT ainda são encontradas em alta incidência nos ecossistemas aquáticos em Portugal (CARVALHO et al., 2009), em sedimentos no Japão (HARINO, 2009) e em sedimentos e na biota em regiões brasileiras (COSTA, 2012; BORGES, 2012). As tintas à base de tributilestanho ainda são mais eficientes que as alternativas atuais disponíveis no mercado para o mesmo fim (SANTOS et al., 2011) e apesar da substituição das tintas à base desse composto pelos novos anti-*fouling*s TBT-free, essa nova geração de substâncias também agrega efeitos prejudiciais ao meio ambiente (KARLSSON, 2004). Os anti-*fouling*s TBT-free (de 3ª geração) são compostos de classes diferentes, como organometálicos, organoclorados, clorofluanido e triazinas, que surgiram como alternativa ao TBT, mas que também revelam alta toxicidade (YEBRA et al., 2004; CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011). Tintas anti-incrustantes à base de cobre geralmente requerem biocidas de reforço para garantir sua eficácia, podendo oferecer riscos adicionais em decorrência do uso concomitante de substâncias em uma mesma formulação (SANTILLO et al., 2001 OKAMURA; MIENO, 2006).

No Brasil, em 1º de novembro de 2012, entrou em vigor uma revisão da resolução nº 421 de fevereiro de 2010 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), que oferece informações sobre as condições e padrões de qualidade de água no Brasil, bem como o gerenciamento de substâncias químicas, como o TBT (CASTRO et al., 2007; CONAMA, 2012). Embora a implantação dessa legislação represente um avanço, o desconhecimento a respeito dos possíveis impactos que podem ser gerados por esses compostos ressaltam a necessidade de realizar estudos mais detalhados para definir numericamente o grau de interferência produzida por diferentes concentrações de COE's, bem como o grau de patogenicidade fornecido pela visão temporal de exposição às substâncias (GOLDBERG, 1986; BECH et al., 2002).

Nos últimos anos, a necessidade de se obter informações mais detalhadas a respeito dos efeitos ocasionados pela exposição de gastrópodes à COE's tem sido destacada em função do histórico de aplicação deliberada a partir da década de 80 (RITSEMA; LAANE, 1991) poder ainda repercutir nos dias atuais, apesar do

banimento aos COE's em 2008, uma vez que a substancial persistência dos contaminantes nos sedimentos pode atingir meia-vida de dezenas de anos (KOTRIKLA, 2009; DOWSON et al., 1994, 1996).

O desenvolvimento dos caracteres masculinos nas fêmeas imposexadas varia de acordo com a espécie (GIBBS et. al.,1991), e em função do seu comportamento dose-resposta, é dependente da concentração ambiental do poluente (GIBBS; BRYAN, 1996; ALZIEU, 2000) e do tempo de exposição do organismo ao contaminante (ABIDLI et al., 2012; FERNANDEZ, 2001), sendo que 15 dias de contato direto com o TBT já pode ser considerado o tempo suficiente para provocar alterações em algumas espécies de gastrópodes (ABIDLI et al., 2012). Além do tempo de exposição, o tamanho dos indivíduos também pode influenciar no desenvolvimento e expressão do imposex, pois, segundo Mensink e outros (2002), indivíduos adultos são menos sensível à exposição ao TBT em relação a juvenis, uma vez que estes últimos não estão dotados do sistema genital totalmente desenvolvido, e quaisquer agentes podem provocar interferência no desenvolvimento de órgãos sexuais na primeira fase da vida.

Tendo em vista o exposto, a presente pesquisa teve por objetivo verificar o desenvolvimento de imposex em jovens e adultos de *Leucozonia nassa* em função do tempo de exposição e da concentração final de TBT em água. Neste contexto, a hipótese do presente trabalho é que a *L. nassa* seja uma espécie sensível a 5ng TBTL⁻¹ e que a mesma concentração do composto seja capaz de induzir imposex em jovens e adultos dessa espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo constam as principais informações a respeito da utilização histórica dos compostos organoestânicos, suas principais características e aplicabilidades.

2.1 BREVE HISTÓRICO E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO

O estabelecimento de comunidades bioincrustantes no substrato de embarcações produz rugosidade que aumenta a taxa de corrosão dos barcos, o fluxo turbulento, o ruído acústico e gera maior arraste devido ao aumento no atrito com a água, resultando em perda de velocidade de navegação, gastos adicionais com combustíveis e manutenção das embarcações (CHAMP; PUGH, 1987; BASHEER et al., 2002; YEBRA; KILL; DAM-JOHANSEN, 2004). O emprego de tintas anti-incrustantes reduz o transporte de espécies de um ambiente para outro, o volume de consumo de combustíveis fósseis, evita o lançamento de dezenas de toneladas de dióxido de carbono na atmosfera por ano e agrega aumento do tempo entre as docagens (ABBOTT et al., 2000; YEBRA; KILL; DAM-JOHANSEN, 2004; EVANS et al., 2000; CASTRO et al., 2007; BASHEER et al., 2002; BRASIL, 2007; KOTRIKLA, 2009).

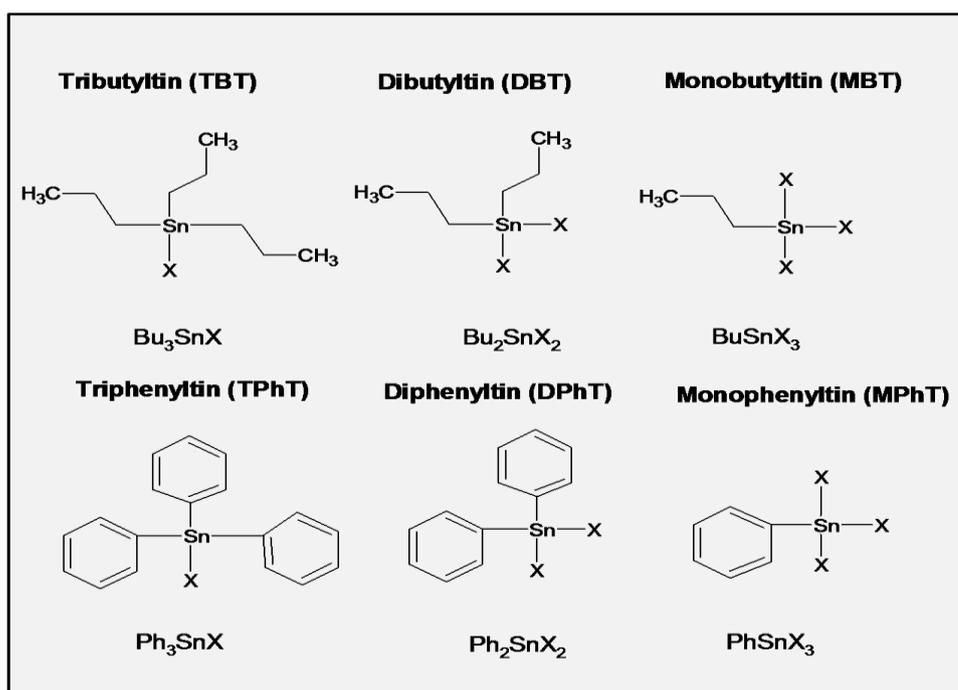
O primeiro registro do uso de anti-incrustantes foi feito por volta de 1500 a.C. a 300 a.C. pelos fenícios, que aderiram à técnica de adição de folhas de cobre aos cascos de embarcações ao notarem que a navegação se tornava mais rápida e fácil quanto mais lisa estivesse a parede do barco (CHAMP; PUGH, 1987). Posteriormente surgiram registros do uso de chumbo como alternativa anti-incrustante para embarcações, entretanto, o cobre se mostrou mais eficiente para desempenho de tal função ao longo dos séculos XVII e XVIII (CHAMP; PUGH, 1987).

Formulações com adicionais de arsênico e mercúrio também tiveram ampla utilização para potencializar a propriedade biocida de tintas à base de óxido cuproso, até a descontinuação do uso em 1970, decorrente da elevada toxicidade que ofereciam e rápida perda de eficiência (CHAMP; PUGH, 1987; SANTOS et al., 2011). Em meados da década de 60, os compostos organoestânicos (COE's), como o tributilestanho (TBT) e o trifenilestanho (TPT), passaram a ser utilizados em tintas

anti-fouling (CHAMP, 2000; FERNÁNDEZ-ALBA; HERNANDO; CHISTI, 2002; TENHALLERES-TJABBES; KEMP; BOON, 1994).

Os Compostos organoestânicos pertencem à classe de organometálicos dos poluentes: Tributilestanho (TBT), Dibutilestanho (DBT), Monobutil-estanho (MBT), Trifenilestanho (TPhT), Difenilestanho (DPhT) e Monofenil-estanho (MPhT) (Figura 1) (SANTOS et al., 2011).

Figura 1 - Compostos Organoestânicos (COE's).



Fonte: Santos *et al.*, 2011.

O TBT é um composto formado por um átomo de estanho (Sn) e 3 radicais butílicos (C_4H_9) (Figura 2). Pode se apresentar na forma de cátion livre (TBT^+) e por ser instável, pode combinar-se com oxigênio para formar o bis(TBT)O ou fluoreto, resultando em TBT- Fluoreto (TBTF) (DELA CRUZ, 1998).

Figura 2- Estrutura química do TBT+, $(C_4H_9)^3 Sn^+$



Fonte: Modificado de DELA CRUZ, 1998.

As tintas anti-*fouling*s são classificadas em 3 tipos: Convencional, Matriz solúvel e copolímero de polimento (Tabela 1).

Tabela 1- As gerações de tintas anti-incrustantes.

Tipo	Característica	Exemplo
Convencional	Altas concentrações na matriz (7,5% ppm)	bis (TBT)O
Ablativa	Taxa de liberação decai exponencialmente com o tempo	
Copolímero	Baixas concentrações iniciais (2,5% ppm) e taxa de liberação aproximadamente constante no tempo	Copolímero de metilmetacrilato/metacrilato de TBT

Fonte: Fernandez, 2001

As tintas convencionais, ou de "associação livre" pertencem à primeira geração das tintas anti-incrustantes de formulações à base de óxidos de cobre e zinco que são liberados por lixiviação na água circundante; a matriz solúvel ou ablativo, de segunda geração utiliza o TBT e TPT como princípio ativo; e a copolímero de polimento pertence à terceira geração de tintas anti-*fouling*s e engloba compostos orgânicos metálicos (Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine, Clorotalonil, Tiram, Busan, TCMS Piritina e Trifenilbornano Piridina) e não metálicos (Zinco Piritina, Cobre Piritina, Ziram, Óxido cuproso, Tiocianato de cobre e Naftenato de cobre) (HOCH, 2001; FERNANDEZ, 2007; BAALS, 1987; CHAMP; PUGH, 1987; YEBRA; KILL; DAM-JOHANSEN, 2004; CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011). As tintas de

terceira geração foram desenvolvidas a partir de 1987, pós limitações parciais das tintas à base de organoestânicos, e são caracterizadas por aumentarem o intervalo entre docagens de 1 para 4 anos, e poderem ser utilizadas concomitantemente em uma mesma formulação (BAALS, 1987; OKAMURA; MIENO, 2006).

A eficiência da utilização do TBT com finalidade anti-incrustante é de consenso global (CHAMP, 2000; MORA; PHILIPS, 1997) e tal composto ganhou popularidade a partir da década de 60 (OEHLMANN et al., 1998). Os COE's chegaram a revestir 90% dos cascos das embarcações na década de 80, quando passaram a substituir as tintas à base de cobre (LUDGATE, 1987). A produção mundial e uso dos COE's atingiu um nível de cerca de 5000 toneladas por ano, com liberação diária ao mar de $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (BANNET, 1996; SWENNEN et al., 1997). Aproximadamente 4300t de organoestânicos foram liberadas no ambiente marinho em 1976 (DONARD et al., 1989).

Os principais problemas envolvidos com a utilização de COE's são a série de distúrbios metabólicos gerados nos organismos não alvos (STEGEMAN et al., 1992), a elevada persistência ambiental e bioacumulação na cadeia alimentar (BAINY; MARQUES, 2001; LIMA et al., 2006), a presença de coquetéis de misturas de compostos derivados (YEBRA; KILL; DAM-JOHANSEN, 2004) e a abordagem multicompartimentar e multitoxicante (EVANS et al., 2000; COSTA, 2012).

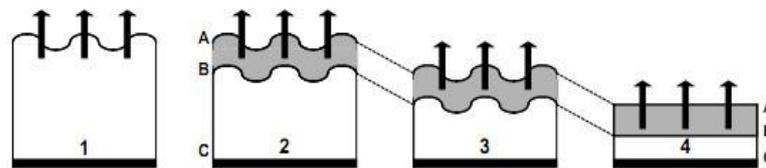
Para alguns autores, o "TBT é a substância xenobiótica mais tóxica deliberadamente introduzida no meio" (STEWART et al 92) e os impactos produzidos geram informações sobre o efeito da contaminação no ambiente (ALZIEU et al., 1986). Para moluscos, a toxicidade dos COE's aumentam a partir da adição de radicais butil de 1 para 3, e posteriormente sofre redução com a adição do quarto radical; em função disso, recomenda-se que a classe de estudos desses compostos envolvam o cátion dissociado (Bu_3Sn^+) e seus metabólitos formados pela desbutilação até a formação do estanho orgânico (BRYAN; LANGSTON, 1992; CHAMP; PUGH, 1987; (AXIAK et al., 1995). A contaminação é registrada como sendo mais séria quanto menor for a circulação da água, refletindo elevados índices de contaminação em marinas, terminais de pesca e portos (EVANS; NICHOLSON, 2000).

2.2 ANTI-INCRUSTANTES ORGANOESTÂNICOS NO AMBIENTE MARINHO

Restrições presentes e futuras não são capazes de remover imediatamente o TBT e seus produtos de degradação do meio ambiente marinho, por serem capazes de ficar retidos nos sedimentos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Estimativas de meia vida altas dos compostos organoestânicos no sedimento demonstram que estes são uma fonte potencial para a acumulação de COE's e a longo prazo, a ocorrência de níveis altos de TBT poderia servir como ameaça para os habitats aquáticos em imediações de marinas (DOWSON, et al., 1994, 1991), além da sua migração para a coluna d'água poder afetar organismos não alvos por muitos anos (FERNANDEZ et al., 2005).

Em contato com a água, o copolímero hidrofóbico inicia uma reação de saponificação que rompe a ligação do TBT com a estrutura do polímero causando sua liberação (Figura 3) (FERNANDEZ, 2001).

Figura 3 - Processo de auto-polimento do copolímero à base de TBT.



(1) Tinta recém-aplicada. O cátion TBT^+ está sendo liberado e a superfície saponificada para criar uma camada de lixiviação.

(2) A-B: camada de lixiviação hidrofílica (5-20 μm de espessura), liberando TBT. B: interface na qual o copolímero reage com a água para liberar o biocida. B-C: zona hidrofóbica (100-300 μm de espessura), que compreende a massa de pintura disponível.

(3) Liberação do biocida em taxa aproximadamente constante. A espessura da pintura reduz-se progressivamente.

(4) A liberação continua com a pintura auto polindo-se até o casco da embarcação.

Fonte: FERNANDEZ, 2001. Modificado de CHAMP; PUGH, 1987.

Após sua aplicação, o TBT é liberado na água por meio do desgaste da pintura naval e é rapidamente absorvido por agentes orgânicos como bactérias e algas, ou integra-se à camada de partículas em suspensão na água (GADD, 2000; LUAN et al., 2006; SAYER et al., 2006).

Essa liberação caracteriza uma entrada direta ou indireta deste composto e seus produtos de degradação no meio aquático, tanto na água como na biota. As partículas em suspensão são responsáveis pela adsorção da substância, assim como o sedimento (HOCH, 2001).

O mecanismo de degradação do TBT pode ser acelerado por temperatura, aumento de radiação UV e atividade biológica via mecanismos de degradação de microorganismos em solo e ambientes de água doce, marinhos e estuarinos (DUBEY, 2003; GADD, 2000).

A afinidade de COE's por partículas sólidas os caracterizam como bioacumuladores (LANGSTON; POE, 1995), servindo como fonte de contaminação para a coluna d'água, mesmo após a descontinuidade do uso do poluente (FERNANDEZ, 2001). Para Fernandez (2001) a afinidade por partículas varia na ordem crescente do MBT, posteriormente atingindo TBT e o DBT e a afinidade maior atribuída ao MBT está associada à sua carga maior.

Nas décadas de uso indiscriminado dos compostos organoestênicos, registrou-se 500-1000 $\mu\text{g TBTL}^{-1}$ no sedimento (CLARK et al., 1988). Concentrações de 1 a 2 $\mu\text{/kg TBT}$ foram reportadas por Stewart e Thompson (1994) em sedimentos a 377 metros da superfície, podendo destacar a ocorrência de registros de contaminação em mar aberto, para regiões fora das áreas costeiras.

A degradação do TBT na coluna d'água é considerada um processo rápido (CLARK et al., 1988), diferentemente do que se observa nos sedimentos, como reportou Dowson e outros (1996) em um experimento que se obteve contaminação até 775 dias após a aplicação da substância em superfícies oxidantes.

A contaminação ambiental por COE's têm recebido considerável atenção devido a natureza bioacumulativa e toxicidade dessas substâncias (SMITH 1981; GIBBS; BRYAN, 1987; HORIGUSHI et al., 1994; MENSINK et al., 2002). Muitos estudos têm demonstrado que o TBT é altamente tóxico para uma grande variedade de organismos não-alvos (FENT, 1996; SWENNEN et al., 2009) e causam danos que podem ser irreparáveis à vida marinha (RUIZ et al., 1996).

2.3 EFEITOS DO TBT SOBRE ORGANISMOS MARINHOS

O primeiro registro de imposex foi reportado em *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758) na costa da Inglaterra (BLABER, 1970). Subsequentemente, os efeitos do impacto ecológico da contaminação por TBT foram observados no final da década de 70, na área cercada por pequenos portos na Baía de Arcachon, França (ALZIEU et al., 1986; ALZIEU, 2000a). Os efeitos deletérios do colapso resultaram na queda da produção de indivíduos de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), pela inibição da calcificação nas larvas do bivalve (*balling*), gerando mortalidade larval, falência reprodutiva e deformação nas conchas de indivíduos adultos (MICHEL; AVERTY, 1999; ALZIEU, 2000, 1986). Os efeitos da contaminação por TBT em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento larval de *C. gigas* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeitos do TBT sobre a embriogênese e desenvolvimento de larvas de *Crassostrea gigas*

TBT ($\mu\text{g}/1$) (PPM)	Efeitos na reprodução
100	Inibição na fecundação
50	Inibição da segmentação
25	Redução parcial da segmentação
10	Ausência da formação de Trocophora
3-5	Ausência de véligers – Mal formação de Trocophoras
1	Véliger anormal – Mal formação de Trocophora
0,5	Numerosas anomalias – Mortalidade total em 8 dias
0,2	Perturbação na assimilação de alimentos – Mortalidade total após 12 dias
0,1	Crescimento devagar, quase todas mortas após 12 dias
0,05	Crescimento devagar: Alta mortalidade após 10 dias
0,02	Sem efeitos observados

Fonte: CHAMP; PUGH, 1987

Alguma preocupação tem sido recentemente expressa sobre os efeitos do TBT em água do mar sobre organismos não-alvos, revelando efeitos deletérios (BAALS, 1987). O TBT se mostrou prejudicial a organismos de diversos táxons: algas (SMOCK; SRONEBURNER; CLARK, 1976), plantas aquáticas (CHU, 1976; JENSEN et al., 2004), crustáceos (OHJI, et al., 2002), poríferos (FAFANDEL et al., 2003), equinodermos (NOVELLI et al., 2002), peixes (AXIAK et al., 2000), cetáceos, (KIM et

al., 1996; TANABE et al., 2011), aves marinhas (GURUGE et al., 1997) e aos seres humanos (FERNANDEZ et al., 2005).

Tabela 3 – Táxons animais afetados por organoestânicos

Grupo	Efeito (Faixa de concentração)	Referência
Fitoplâncton	Limita a divisão celular	ALZIEU (2000)
Zooplâncton	Limita a reprodução	ALZIEU (2000)
Equinodermos	Toxicidade letal [EC50] para as células do esperma (2,97-18,5 mg / L e 1,11-2,62 mg / L para os embriões)	NOVELLI et al. (2002)
Cnidários (Corais)	Inibe a fertilização	NEGRI & HEYWARD (2001)
Bivalves (Ostras)	Inibe a metamorfose; Anomalias reprodutivas (20ng L ⁻¹) Anomalias na calcificação da concha (>2ng L ⁻¹)	ALZIEU (2000)
Gastrópodes	Imposex e intersex (<1ng L ⁻¹)	ALZIEU (2000)
Poliquetas	Anomalias de desenvolvimento	MEADOR & RICE (2001)
Crustáceos	Anomalias no processo de muda (<500 µg L ⁻¹)	ALZIEU (2000)
Urocordados	Alterações a nível celular (10 µg L ⁻¹) Embriotoxicidade (0,1 µg L ⁻¹)	MONIOTT et al. (1993) CIMA et al. (1996)
Peixes	Anomalias reprodutivas (1- 10 µg L ⁻¹) Alterações no comportamento (1- 100 µg L ⁻¹)	ALZIEU (2000) SHIMASAKI et al. (2003)
Aves	Imunossupressão	KANNAN et al. (1997)
Mamíferos	Imunossupressão Efeitos citotóxicos	KANNAN et al. (1997)

Fonte: Adaptado de CASTRO, 2007

Cerca de 200 espécies de neogastrópodes podem ser afetadas por TBT e desenvolver imposex em todo o mundo (TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011), e tem surgido novos trabalhos utilizando mesogastrópodes. Em 2006, Vishwakiran e outros e posteriormente Costa e outros em 2008, trabalharam contaminação com o mesogastrópode *Cymatium parthenopheum parthenopheum*, e em 2012, Costa desenvolveu estudos com *Littoraria angulifera*, ambos organismos considerados menos sensíveis à contaminação por COE's.

No Brasil, o imposex em *Stramonita haemastoma* foi reportado em primeira mão por Magalhães e outros (1997), na Baía de Santos, Rio de Janeiro e a *posteriori* surgiram ocorrências da síndrome para mesma espécie na Baía de Guanabara, Rio

de Janeiro, por Fernandez e outros (1998), e em Fortaleza, Ceará, por Castro e outros (2000).

A indução de imposex tem sido observada em vários experimentos de campo (SHIM et al., 2000; BECH et al., 2002; RIBEIRO, 2002; CASTRO, 2005) e laboratoriais (GIBBS et al., 1987; LIMA, 2004). Os navios comerciais maiores em seus processos de manutenção (raspagem, pintura, etc) tem sido reconhecido como um dos principais fatores que contribuem para manutenção dos problemas ocasionados pela síndrome do imposex (BAILEY; DAVIES, 1988).

Efeitos severos sobre a reprodução relacionada à esterilidade ocasionada por imposex em fêmeas de *Nucella lapillus* e *Ocenebra erinacea* são conhecidas e foram descritas por Gibbs e outros (1991). Na Baía de Guanabara, também foram registradas mudanças significativas na colonização por *Stramonita haemastoma* no início dos anos 60 ao final dos anos 90, e nessa região, as populações não são mais encontradas (FERNANDEZ, 2004).

A diferenciação e crescimento dos órgãos genitais masculinos em fêmeas de gastrópodes é resultado da inibição da ação do Citocromo P450, que acaba sendo impedido de converter testosterona em 17β -12 estradiol, elevando níveis de testosterona nos tecidos corporais (LEUNG et al., 2006). Os caracteres masculinos podem levar à obstrução da abertura vaginal e rompimento da glândula da cápsula pelo desenvolvimento da epiderme e tecidos que cercam o vaso deferente (GIBBS; BRYAN, 1986).

Mesmo em níveis abaixo de ppt na água do mar, o TBT pode causar imposex e falência reprodutiva em gastrópodes (BRYAN et al., 1986; HUGGETT et al., 1992), além de desordens imunológicas, neurotóxicas e genéticas em outros animais (BRYAN e GIBBS, 1991; ALZIEU, 2000; USEPA, 2004).

Faixas de concentrações diversas de TBT podem ocasionar efeitos prejudiciais em organismos: Valores inferiores a $1,2\mu\text{g L}^{-1}$ de estanho são capazes de impedir o desenvolvimento da fase planctônica de bivalves (RUIZ et al., 1996), enquanto que concentrações em torno de $34\mu\text{g L}^{-1}$ inibem a eclosão de larvas de ascídeas (GIAGUZZA et al, 1996). Larvas de *Stramonita clavigela* tem seu desenvolvimento interrompido quando expostas à concentração letal (CL 50) de 1 a $5\mu\text{g TBTL}^{-1}$ em 48 horas (HORIGUSH et al., 1998).

Oehlmann e outros (1991) estudando *Nucella lapillus* propôs que haveria diferença genética nas rotas de desenvolvimento de imposex, que estaria associado ao polimorfismo cromossomal. No sudeste da Inglaterra, Gibbs (1993) constatou que alguns indivíduos de *N. lapillus* haviam sobrevivido enquanto que a maior parte da população havia sido eliminada pela contaminação por organoestânicos. Os machos dessa população apresentavam uma anomalia genética conhecida como Síndrome de Dumpton, que desencadeava o subdesenvolvimento do sistema genital masculino, e as fêmeas dessa população apresentavam maior resistência à contaminação, desenvolvendo graus menores de imposex.

No outro tipo de masculinização feminina, o ovo-testis, a fêmea de gastrópode é classificada como macho por conta da oogênese ser suprimida e/ ou haver desenvolvimento de espermatogênese e túbulos seminíferos. Esse fenômeno foi observado a primeira vez em *N. Lapillus* exposta a TBT em condições laboratoriais por aproximadamente dois anos (GIBBS et al., 1987). Entre as espécies que foram detectadas com ovo-testis estão *Ocenebrina articulata* (OEHLMANN et al., 1996), *Nassarius reticulatus* (BARROSO; MOREIRA, 1998), *Babylonia japonica* (HORIGUSHI et al., 2006).

2.4 CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO E A SAÚDE HUMANA

A possibilidade de biomagnificação e transferência de organoestânicos para níveis tróficos superiores permite que as anomalias penetrem nas cadeias alimentares, podendo gerar danos subsequentes à saúde humana. (OEHLMANN et al., 1996).

O TBT demonstrou ser um inibidor *in vitro* da atividade da aromatase do citocromo P450 em seres humanos (Cooke, 2002; Heidrich et al , 2001) Sekizawa e outros (2003), Strand e Jacobsen (2005) desenvolveram estudos a respeito da toxicidade do TBT para moluscos e seus efeitos peculiares, específicos e bioacumuladores, refletindo seus efeitos tóxicos em seres humanos, uma vez que os moluscos são comercializados e empregados na alimentação (ARAÚJO; ROCHA-BARREIRA, 2005; BOEHS et al., 2008).

A principal via comum de contaminação para os seres humanos, além de outros animais, é pelo consumo de mariscos (SEKIZAWA et al., 2003; HOCH, 2001; WHO,

1990) e a absorção dos alimentos contaminados apresenta maior capacidade de captação direta dos poluentes do que em relação à captação direta a partir da água (WHO, 1990).

Schweinfurth e Günzel (1987) relataram que compostos de TBT podem causar irritações nas membranas da pele e das mucosas, por isso, recomenda-se evitar o contato com a pele, olhos e a inalação de poeira. Alzieu (1998) afirma que a partir de sucessivas exposições, há possibilidade das irritações gerarem dermatites severas. Em estudos de dose repetida, linfotoxicidade e toxicidade hepatobiliar são os achados predominantes (KOTRIKLA, 2009). Exposição humana acidental ao TBT em pequenas concentrações pode causar dermatite e irritação nos olhos e no trato respiratório (CHAMP, 2000).

Reid (1986) descreveu os principais problemas à saúde que profissionais que realizam manutenção de embarcações revestidas à base de TBT estão expostos: inflamação crônica da pele, problemas respiratórios, dores de cabeça e no estômago, lacrimação e resfriados frequentes.

Alguns trabalhos tem evidenciado os riscos desses compostos para a saúde humana em indivíduos que se alimentam preferencialmente de alimentos de origem marinha (GUÉRIN et al., 2007) por meio de modelos animais (GROTE et al., 2004), e/ou em estudos *in vitro* (SAITOH et al., 2001; CARFI et al., 2008). Em um desses ensaios, o TBT altera o funcionamento da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, aumentando a concentração de cálcio intracelular e sinalizando para apoptose em tímócitos (KASS; ORRENIUS, 1999).

Com o aumento da preocupação pública sobre possíveis efeitos perigosos para a saúde humana resultante da exposição ao TBT, o consumo de alimentos de origem marinha tem sido descrita como uma importante via de contaminação (AZENHA; VASCONCELOS, 2002; CHIEN et al., 2002; FORSYTH; JAY, 1997). Produtos pesqueiros marinhos podem conter altas concentrações de TBT e diferentes dietas podem resultar em diferentes quantidades presentes nos tecidos e sangue humano (LO et al., 2003). Entretanto, evidências sobre tais fontes de exposição ao TBT ainda são limitadas.

Mesmo em países com altos índices de consumo de alimento de origem marinha, há poucos dados sobre os níveis de COE's nesses alimentos. (SANTOS et al., 2009).

Assim, o risco para a saúde humana tem sido baseado em estudos imunológicos com animais experimentais e na dieta humana estimada de alimentos contaminados com TBT (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

2.5 LEGISLAÇÃO

A demanda crescente da utilização das tintas anti-incrustantes levou à contaminação por esses compostos ser tratada como problema global (ELLIS; PATTISINA, 1990), levando a restrições da utilização de agentes anti-incrustantes em embarcações em uma série de países (FOLSVIK et al., 1998).

Frente ao caso de redução na produção de *C. gigas*, promovido pelo efeito tóxico dos anti-fouling, o governo francês foi o primeiro país a instituir legislação para proibição da aplicação das tintas à base de TBT por um período experimental inicial de três meses (MICHEL; AVERTY, 1999; ALZIEU, 2000, 1986; CHAMP, 2000; YEBRA; KILL, DAM-JOHANSEN, 2004). Em janeiro de 1982 o regulamento coibiu o uso de tintas contendo mais de 3% de TBT para embarcações com menos de 25 metros de comprimento que trafegavam as regiões da Costa do Atlântico e posteriormente, em setembro do mesmo ano, o banimento foi estendido para toda a costa francesa. (WHO, 1990).

A Organização mundial da saúde (WHO) evidencia o surgimento de legislações quanto à utilização de tintas à base de TBT para o Japão e Austrália; sendo o regulamento adotado pelo governo japonês em dezembro de 1979, a partir da suspensão da utilização de compostos de tributestanho de determinados produtos têxteis para uso doméstico, e na Austrália, as medidas de controle sobre o uso de tintas à base de TBT tintas foram introduzidos barcos com um casco de comprimento inferior a 25 metros, e para embarcações maiores que promovessem taxa de lixiviação de 5.0 ng/cm² por dia. Proibições subsequentes, em 1989, foram aderidas pelo Canadá, Nova Zelândia e Austrália, e pela legislação europeia em 1991 (Evans, 2000).

Em Portugal, a restrição do uso de tintas à base de TBT para pequenas embarcações foi adotada em 1993, entretanto, em função do uso não contemplar embarcações maiores, o uso contínuo dos compostos de TBT em grandes navios

causou problemas comerciais em portos comerciais e pesqueiros do Rio de Aveiro (BARROSO et al., 2000).

A partir de 1988, com os problemas causados pelas tintas anti-incrustantes, a IMO (International Maritime Organization) formou uma equipe técnica para pesquisar os efeitos das tintas anti-*fouling* sobre a saúde ambiental e humana, que formou pareceres que posteriormente levaram à adoção da Resolução A.895 (21), em novembro de 1999 pela IMO, que recomendava a adoção de medidas que propusessem limites para o uso indiscriminado dos COE's à base de TBT (BRASIL, 2007).

Em 2001, a IMO aprovou a Convenção de Sistemas (AFS) que propôs o banimento global à aplicação de anti-incrustantes à base de TBT a partir de janeiro de 2003, e foi efetivamente adotada em janeiro de 2008 (BRASIL, 2007).

Em 2005, foi aprovada pelo Ministério do Meio Ambiente a Resolução CONAMA 357/05, que estabeleceu os valores máximos permitidos para os contaminantes para água doce ($2\mu\text{g/L}$ TBT), salina, ($0,01\mu\text{g/L}$ TBT) e para águas salobras, ($0,010\mu\text{g/L}$ TBT). Porém, apenas em 2008 foi decretado pela IMO o banimento permanente do uso de tintas com COE's em navios (SANTOS et al., 2011). Vários anos após o banimento, ainda é possível encontrar níveis altos de TBT presentes no sedimento e em organismos tanto de meiofauna quanto da macrofauna (DOWSON et al., 1994; KO et al., 1995; DAHLLOF et al., 2001; ANTIZAR-LADISLAO, 2008; COSTA, 2012).

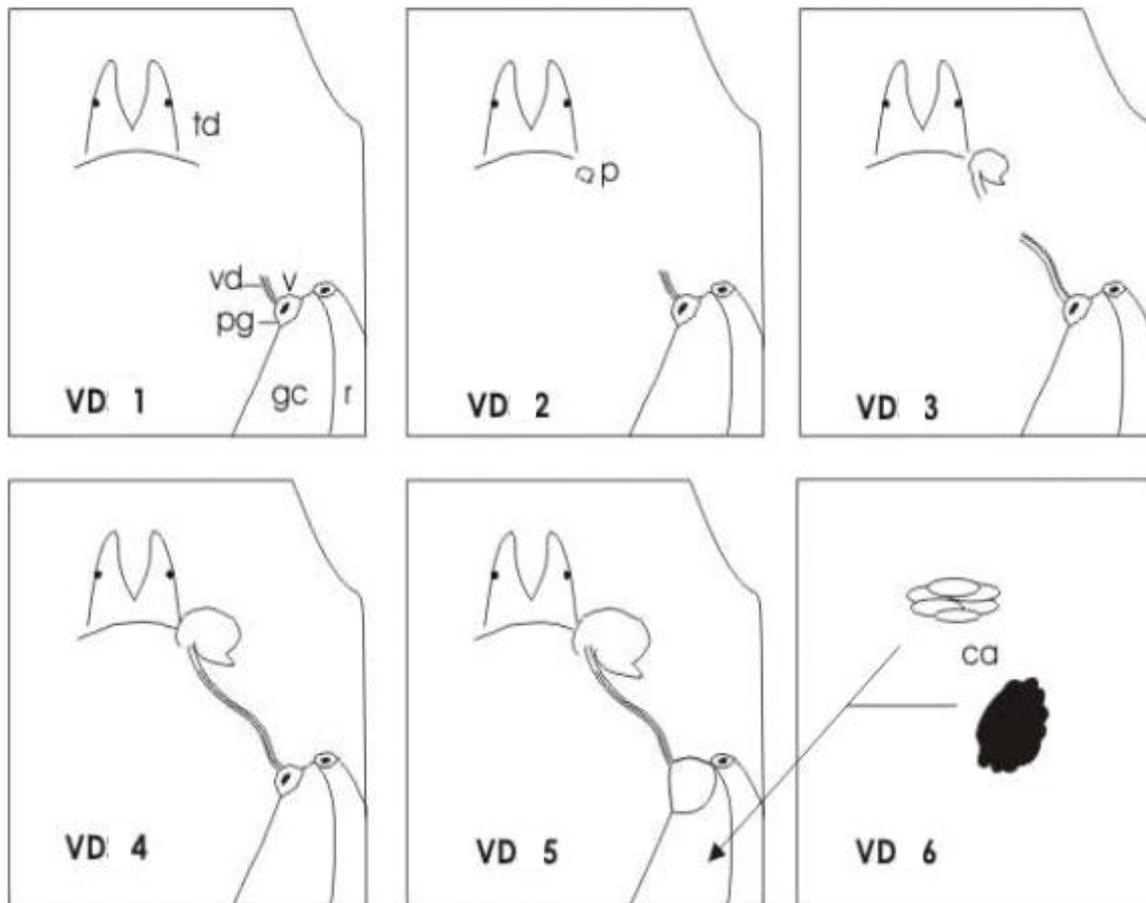
Existe legislação aplicada em alguns países para regular o uso de biocidas em tintas anti-*fouling*, como o Diuron e o Irgarol 1051, devido às suas propriedades tóxicas serem significativas mesmo quando presentes em baixas concentrações, e em função da elevada persistência no ambiente (DAFFORN; LEWIS; JOHNSTON, 2011; CRESSWELL, 2006) O Diuron teve sua aplicação proibida em tintas anti-*fouling* na Austrália, o Irgarol 1051 não é permitido na Holanda (BANNINK, 2004) e ambos foram banidos na Dinamarca (DEPA, 2008).

2.6 ESCALAS DE QUANTIFICAÇÃO DE IMPOSEX

Uma das espécies até hoje mais estudadas para o imposex é *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758), por ser uma das espécies mais sensíveis à bioindicação de

poluição por TBT (TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011). Para esses animais, Fernandez e outros (2002), Gibbs e outros (1987) e Oehlmann e outros (1991) descreveram o desenvolvimento do imposex em seis estágios. Para Gibbs e outros (1987) o desenvolvimento do vaso deferente (VD) se dá no estágio 1 sem que haja a formação do pênis propriamente dito, pois este só aparece a partir do estágio II. A partir do estágio III o VD já atinge metade do seu desenvolvimento, que é completado no estágio IV. No estágio V, a fêmea imposexada apresenta a papila genital obstruída e no estágio VI, a glândula da cápsula está repleta de cápsulas ovíferas (Figura 4).

Figura 4 - Escala VDSI proposto por Gibbs e outros (1987) para a espécie *N. lapillus*. td: tentáculo direito; vd: vaso deferente; pg: papila genital; gc: glândula da cápsula; p: papila; r: reto; ca: cápsulas ovíferas

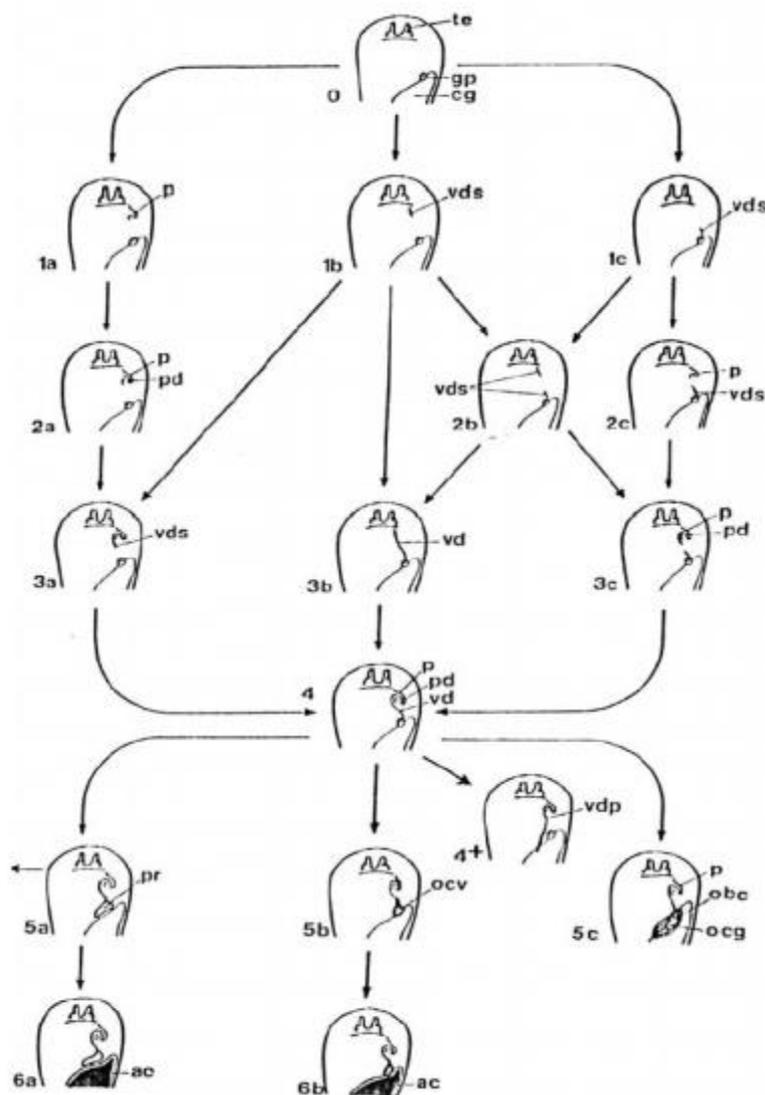


Fonte: Adaptado de Gibbs et al., 1987.

Stroben e outros (1995) criou um índice que leva em consideração rotas alternativas de surgimento de pênis e vaso deferente para as espécies *Trivia arctica*, *Trivia monacha*, *N. lapillus*, *Ocenebra erinacea*, *Hinia incrassata* e *Hinia reticulata* (Figura 5)

Fernandez e outros (2002) propôs uma nova escala de quantificação para *Stramonita haemastoma*, em que o estágio 0 é atribuído a fêmeas normais. O estágio I inclui fêmeas apresentando uma pequena protuberância ou pré-pênis atrás do tentáculo direito. No estágio II, um pequeno pênis é visível. No estágio III, o pênis é um pouco maior e um vaso deferente incompleto pode ser observado no teto da cavidade palial. No estágio IV, o vaso deferente está completo, e o pênis da fêmea atinge um tamanho maior do que metade do tamanho médio do macho. O estágio V é caracterizado pela vulva bloqueada e o estágio VI, pela presença de uma massa de ovos na glândula da cápsula.

Figura 5 - Desenvolvimento de imposex. Ac: cápsulas abortadas; cg: glândula da cápsula; gp: papila genital; obc: bursa copulatrix aberta; ocv: oclusão da vulva; p: pênis; pd: ducto penial; pr: próstata; te: tentáculo; vd: vaso deferente; vdp: passagem do vaso deferente pela glândula da cápsula; vds: secção do vaso deferente.



Fonte: Stroben et al. (1992).

Como forma de comparação, foram criados métodos para quantificar a intensidade de imposex em populações a partir dos índices: Porcentagem de incidência de imposex (I%), Índice de sequência do vaso deferente (VDSI), Índice de comprimento relativo do pênis (RPLI) e Índice de tamanho relativo do pênis (RPSI). O VDSI demonstra a evolução do canal do vaso deferente na fêmea é calculado como valor médio de estágios de imposex em uma amostra. O VDSI é o parâmetro biológico mais significativo, pois ele estima a extensão de uma eventual redução da capacidade de reprodução de fêmeas em uma dada população analisada (BARROSO et al., 2000; OEHLMANN et al., 1996).

Outros índices são utilizados para estimar o grau de comprometimento de uma população ou área pelo TBT. A porcentagem de incidência de imposex (%I) ou a porcentagem de fêmeas afetadas e os índices RPLI (Índice de comprimento relativo do pênis) e RPSI (Índice de tamanho relativo do pênis), que relacionam o tamanho do pênis de macho e fêmea (GIBBS et al., 1987; GIBBS; BRYAN, 1986; MINCHIN et al., 1997; OEHLMANN et al., 1991).

Gibbs & Bryan (1987) propuseram o RPSI, que é obtido pela fórmula:

$$RPSI = \frac{(\text{média do comprimento dos pênis das fêmeas})^3}{(\text{média do comprimento dos pênis dos machos})^3} \times 100$$

Posteriormente, foi elaborado um índice que é mais aplicado para espécies com pênis naturalmente mais delgado e para áreas menos impactadas, o RPLI, obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

$$RPLI = \frac{(\text{média do comprimento dos pênis das fêmeas})}{(\text{média do comprimento dos pênis dos machos})} \times 100$$

2.7 A IMPORTÂNCIA DA APLICAÇÃO DE INVERTEBRADOS EM PROGRAMAS DE BIOMONITORAMENTO

O monitoramento é a realização de processos de observações sistemáticas de fins de um ou mais fatores indicadores de problemas específicos, realizado a fim de se

obter informações sobre características no tempo e espaço sobre determinado objeto, permitindo identificar condições as existentes e sua variação num dado período de tempo (TOMMASI, 1977; BAPTISTA, 2008).

Os organismos vivos são muitas vezes excelentes indicadores qualitativos e quantitativos de poluição ambiental, e por estarem continuamente expostos, funcionam como monitores de longa duração, refletindo modificações ambientais que outros métodos de análise muitas vezes não indicam (TOMMASI, 1977; TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011).

O estudo dos indicadores biológicos é frequentemente considerada uma valiosa ferramenta que aliada a processos físicos e químicos e estudos ecológicos e fisiológicos, permite obter-se compreensão a respeito dos impactos poluidores sobre um dado ambiente natural. (TOMMASI, 1977; MAGALHÃES; FERRAO-FILHO, 2008; HARA et al., 2009). O monitoramento ecotoxicológico dos ambientes aquáticos pode ser promovido com o auxílio de moluscos em função de serem organismos bem distribuídos regionalmente, terem elevada visibilidade, importância econômica e ecológica e serem passíveis de se trabalhar com estágios históricos, por alguns terem hábito de vida sésil (TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011).

Quanto à contaminação por compostos organoestânicos, os moluscos são os animais invertebrados mais sensíveis aos efeitos negativos do TBT (BRYAN; GIBBS, 1991). Vários índices para quantificação de imposex foram desenvolvidos no intuito de se utilizar esse fenômeno como marcador da contaminação por organoestânicos; a partir de monitoramentos utilizando o imposex, a relação causa/efeito entre a contaminação por organoestânicos e o desenvolvimento de caracteres masculinizadores em fêmeas foi claramente evidenciada, e demarcada a alta especificidade para decorrência da alteração hormonal desencadeadora da síndrome na presença desses compostos (GIBBS; BRYAN, 1987; SANTILLO et al., 2001).

2.8 ESTRATÉGIAS DE MONITORAMENTO NO AMBIENTE

O monitoramento de compostos organoestânicos no ambiente e seus impactos podem ser avaliados segundo monitoramento de parâmetros biológicos, que exibem alterações causadas pelo contaminante em populações, ou monitoramento químico

direto, via análise de água, sedimento ou nos próprios organismos. Dentre estas, a técnica mais utilizada é a de monitoramento biológico de avaliação de imposex (EVANS et al., 1998; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998). Segundo Evans e outros (1998), esta frequência de uso pode estar associada às dificuldades que abarcam o monitoramento químico, que estão relacionadas ao custo elevado, à proximidade da taxa de limite de detecção do TBT e sua presença no espaço, à possibilidade de escape de análise periódica, devido a sua liberação gradual, e à complexa distribuição do TBT na coluna d'água, influenciada por diversos fatores.

2.8.1 Monitoramento Biológico

As formas mais comuns de monitoramento da contaminação por COE's são as abordagens biológicas, utilizando imposex, *balling* e intersex, entretanto, a possibilidade de realizar monitoramentos combinados são capazes de reduzir as chances de erro (EVANS et al., 1998; PEDRUZZI, 2009).

2.8.1.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando *Balling*

A perda de recrutamento, anomalias e deformações em *Crassostrea gigas* na Baía de Archacon na década de 70 foi o primeiro registro do efeito contaminante do TBT para essa espécie (ALZIEU, 2000, 1986). O *balling* foi descrito como sendo uma perturbação na deposição de cálcio nos bivalves supracitados, promovendo alterações nas proteínas responsáveis pela calcificação da concha (ALZIEU, 1986).

2.8.1.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Imposex

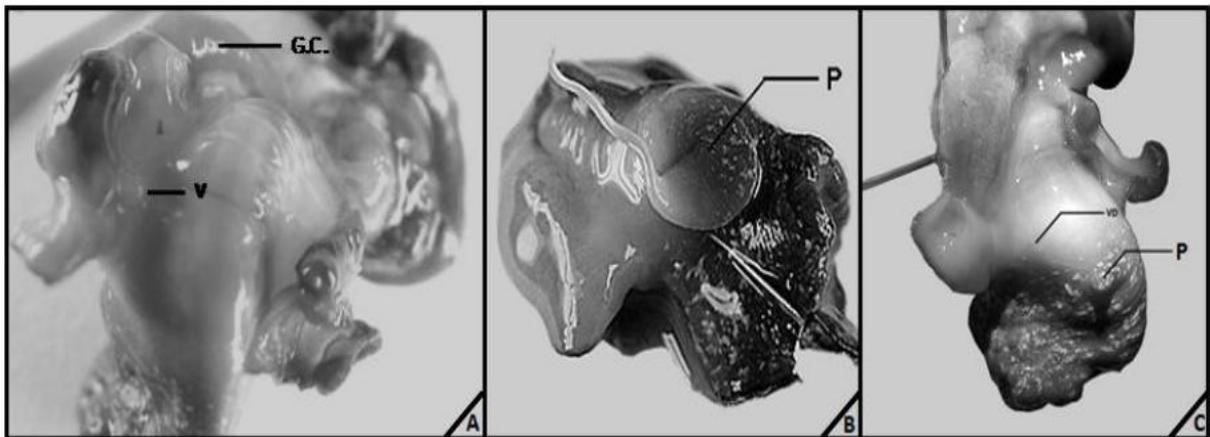
O imposex (Figura 06) é a ferramenta mais utilizada em biensaíes e compreende pesquisas em regiões distintas, usando distintos gêneros como *Cronia konkanensis*, na Índia (VISHUA; ANIL, 1999), *Thais orbita*, na Austrália (FOALE, 1993), *Thais* e *Vasum tubunellis*, na Indonésia (Evans et al., 1995) e *Nucella lapillus* na Alemanha (OEHLMAN, 1998), Espanha (RUIZ et al., 1998) e Japão (HORIGUSHI et al., 1994, 1995).

Em geral, áreas muito contaminadas por TBT exigem elevados índices de imposex (I%) e todas as fêmeas podem estar atingidas em maior ou menor grau (GIBBS et al., 1994).

Devido o desenvolvimento de imposex ser espécie-específico e a sensibilidade dos organismos a esses compostos serem diferentes, nem todas as espécies sofrem o mesmo grau de masculinização (Figura 5) (STROBEN et al., 1995; GIBBS et al., 1997), motivo pelo qual o imposex é considerado a resposta biológica mais sensível a este contaminante, podendo ser utilizado como biomarcador para diferentes níveis de contaminação (GIBBS; BRYAN, 1994, 1996).

Estudos sobre gastrópodes envolveram amplamente espécies do clado Neogastropoda, grupo que aparentemente é mais sensível à contaminação por TBT. A correlação entre o declínio na abundância da biota e o aumento das concentrações de TBT, fornece fortes evidências de que as alterações na comunidade intertidal resultam da poluição por este contaminante (ROACH; WILSON, 2009).

Figura 6 - Animais da espécie *L. nassa*. **A)** Fêmea normal, **B)** Macho e **C)** Fêmea imposexada. GC: Glândula da cápsula; v- vulva; P – Pênis; VD- Vaso deferente.



Fonte: Costa, 2009.

Existem vários mecanismos propostos para explicar essa disrupção endócrina (MATTHIENSSEN; GIBBS, 1998; Horiguchi et al., 1994), incluindo a inibição da aromatase (SPOONER et al., 1991; BETTIN et al., 1996; SANTOS et al., 2005), a inibição da excreção de testosterona (RONIS; MASON, 1996) e a disrupção do sistema neuroendócrino (FÉRAL; LAGALL, 1983).

Estudos que utilizam organismos nativos geralmente possuem em sua metodologia o sacrifício de um número amostral considerável, como é o caso da análise convencional de imposex, na qual chega-se a utilizar centenas de animais de uma mesma população, como ocorre em estudos realizados na Europa (CASTRO et al., 2007), África (LEMGHICH; BENAJIBA, 2007) e América Central (GRAVEL et al., 2006). Visando reduzir o número de animais sacrificados durante esses estudos, Vasconcelos e outros (2006) e Fernandez e outros (2007) desenvolveram metodologias não destrutivas que permitem avaliar os níveis de contaminação, poupando assim muitos animais.

Alguns estudos têm utilizado a histologia como meio para analisar os impactos causados pelo TBT em espécies de gastrópodes, como Oehlmann e outros (1992) com *Ocenebra erinacea* (Linnaeus, 1758), Oehlmann e outros (1996) para *Ocenebrina aciculata* (Lamarck, 1822) e Shi e outros (2005) para *Thais clavigera* (Küster, 1858), *Cantharus cecillei* (Philippi, 1848) e *Babylonia areolata* (Link, 1807).

2.8.1.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Intersex

O intersex consiste em uma transformação gradual do sistema reprodutivo feminino caracterizada por uma perturbação no sexo fenotípico, mudanças entre as gônadas e o trato genital e transformação do oviduto palial em uma próstata não- funcional (BAUER et al., 1995; OEHLMANN et al., 1998; VAN DEN BROECK et al., 2009).

Bauer et al. (1995) descreveu esse hermafroditismo para *Littorina Littorea* (Linnaeus, 1758), espécie sentinela para TBT. Nesta, a intersexualidade ocorre em áreas cuja contaminação é superior a 15ng TBTL^{-1} e apenas pode ser induzido na fase juvenil e em fêmeas imaturas sexualmente, diferentemente de outras espécies (BAUER et al., 1997).

Essa análise é vantajosa, pois pode ser realizada em áreas com maiores níveis de poluição e utilizada quando outros gastrópodes indicadores estão ausentes (OEHLMANN et al., 1998).

Os diferentes estágios do intersex foram descritas por (BAUER et al, 1995, 1997; OEHLMANN et al., 1998) e podem ser enumerados de 0 a 4. No estágio 0 a fêmea encontra-se normal, sem indícios de intersexualidade. No estágio 1 a abertura

genital feminina é aumentada por uma fenda proximal e a bursa copulatrix é dividido ventralmente. No estágio 2 ocorre a divisão da porção ventral do oviduto palial, expondo os lobos internos. Isso deve ser interpretado como uma característica do sexo masculino, pois a próstata nos machos caracteriza-se por um sulco aberto. Quando atinge-se o estágio 3, as glândulas do oviduto palial são totalmente ou em parte suplantada por uma glândula prostática. Ao final do quarto estágio, finalmente, o pênis e o sulco seminal são formados e as fêmeas neste estado não apresentaram espermiogênese.

Ainda segundo Bauer e outros (1995), dos estágios 2 ao 4, há má formação morfológica do oviduto, que inibe a formação da cápsula e a cópula bem sucedida, levando à esterilização das fêmeas.

O principal parâmetro para a quantificação das intensidades da intersexualidade em populações é o índice de intersex (ISI) calculado como o valor médio de estágios intersex, em uma amostra, proposto por Bauer e outros (1995).

Em razão das semelhanças de desenvolvimento dos dois distúrbios, comparações entre eles podem ser feitas. A constatação de que o desenvolvimento de ambos são respostas gradativas, dependentes do nível de exposição ao TBT e que, por conseguinte, são formas de estimar os níveis locais de contaminação, são exemplos destes estudos comparativos (BARROSO et al., 2000).

Por outro lado, uma diferença básica ocorre entre as duas síndromes. No imposex todo o sistema genital feminino é conservado, mas sobreposto por parte dos órgãos masculinos, daí seu nome: imposição sexual. Já no intersex, os órgãos paliais femininos são modificados e suplantados por estruturas morfológicas masculinas correspondentes (BAUER et al., 1995; OEHLMANN et al., 1998; SUNDERMANN et al., 1998).

2.8.2 Monitoramento Químico

As análises combinadas de compostos organoestânicos em tecidos animais, água e sedimento os revela como sendo inquestionáveis causadores de imposex (EVANS et al., 2000).

2.8.2.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando Água

O primeiro material a receber a influência dos anti-fouling é a água e posteriormente o material particulado (LANGSTON; POPE, 1995). Os processos físicos de massas de água promovem a dispersão dos poluentes organoestânicos a partir das áreas fonte gerando gradientes de concentração, mas não são somente estes fatores são responsáveis por tal distribuição ao longo da matriz da água (FERNANDEZ, 2001). Fernandez (2001) afirma que fenômenos como variação na estação anual, variações de maré, alterações no regime de chuvas, no número de embarcações, instalações de estaleiros, piers, marinas e processos de dragagem de portos e canais podem alterar significativamente a concentração de contaminantes na água, em função do seu caráter dinâmico.

A luminosidade é o fator ambiental que afeta diretamente a disponibilidade de TBT ao longo da coluna d'água, e os trabalhos de campo e laboratoriais demonstraram que esta via de degradação possibilita a formação de derivados de TBT, como o dibutil-estanho (FERNANDEZ, 2001). A fotodegradação por luz ultravioleta tem em geral comprimento de onda de 290 nm e energia de 300 kJ/mol, ao passo que a energia necessária para quebrar a ligação carbono-estanho é 190-220kJ/mol (WHO, 1990).

Maguire e outros (1983) propôs que a fotólise sob condições de luz natural em água destilada é limitada, registrando meia-vida de TBT até 89 dias de execução de experimento, e sob condições experimentais de forte luz (300nm), a degradação ultravioleta reduziu a meia-vida do TBT para 1,1 dias (WHO, 1990).

A realização de monitoramento biológico via análise de água enfrenta poucos problemas em termo de matriz, entretanto, as maiores preocupações são referentes ao limite de detecção do contaminante para a análise e a representatividade da amostragem, visto que é necessário um grande número de amostras para se obter informações precisas a respeito da variabilidade temporal e espacial das concentrações (FERNANDEZ, 2001).

2.8.2.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Sedimento

Uma vez liberados na água, os COE's passam para a fase particulada e são adsorvidos nos sedimentos (LANGSTON; POPE, 1995). Em geral, animais expostos à contaminação em sedimento desenvolvem efeitos mais rápidos que animais expostos à água (BARTLETT et al., 2004) em função do potencial de concentração. A acumulação no sedimento fornece informações históricas sobre os poluentes e suas intensidades, a partir da sua distribuição vertical, e em se tratando de dados atuais, quando as taxas de sedimentação são conhecidas, as variações na deposição do poluente pode ser estimada (FORSTNER; SALOMONS, 1984).

A disponibilidade de matéria orgânica é o principal agente controlador do acúmulo de compostos organoestânicos nos sedimentos, e em função da complexidade elevada das porções sedimentares, as análises desse compartimento tendem a sofrer maiores variações e interferências que as análises de água, não recomendando diminuição excessiva no número de amostras requerido para caracterizar o compartimento (LANGSTON; POPE, 1995)

2.8.2.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Material Biológico

Como compartimento, a biota oferece fatores de bioacumulação muito altos, tornando-se conveniente utilizá-la principalmente quando há variação de tempo, visto que as concentrações dos compostos organoestânicos na água são variáveis e funcionam como integrador das concentrações ao longo do tempo (FERNANDEZ, 2001)

As concentrações de COE's medidas nos organismos mostram relações simples com as concentrações medidas na água, no sedimento e tem relação com a distância para as fontes poluidoras (BURT; EBELL, 1995; KAN- ATIREKLAP et al., 1997), e por isso são indicadas para realização de análises combinadas, com associação químicas e físicas para provar as relações causa efeito (AUSTEN; MCEVOY, 1997; GIBBS; BRYAN, 1994)

O desafio em se fazer desta uma técnica confiável, se encontra na obtenção de ferramentas biológicas que respondam às contaminações de forma a produzir resultados concordantes entre o método químico (FERNANDES, 2001).

3 METODOLOGIA

O presente trabalho aderiu à técnica de monitoramento biológico de avaliação de imposex, utilizando-se exemplares de *Leucozonia nassa* para aferir impactos e alterações decorrentes da indução laboratorial de contaminação por TBT.

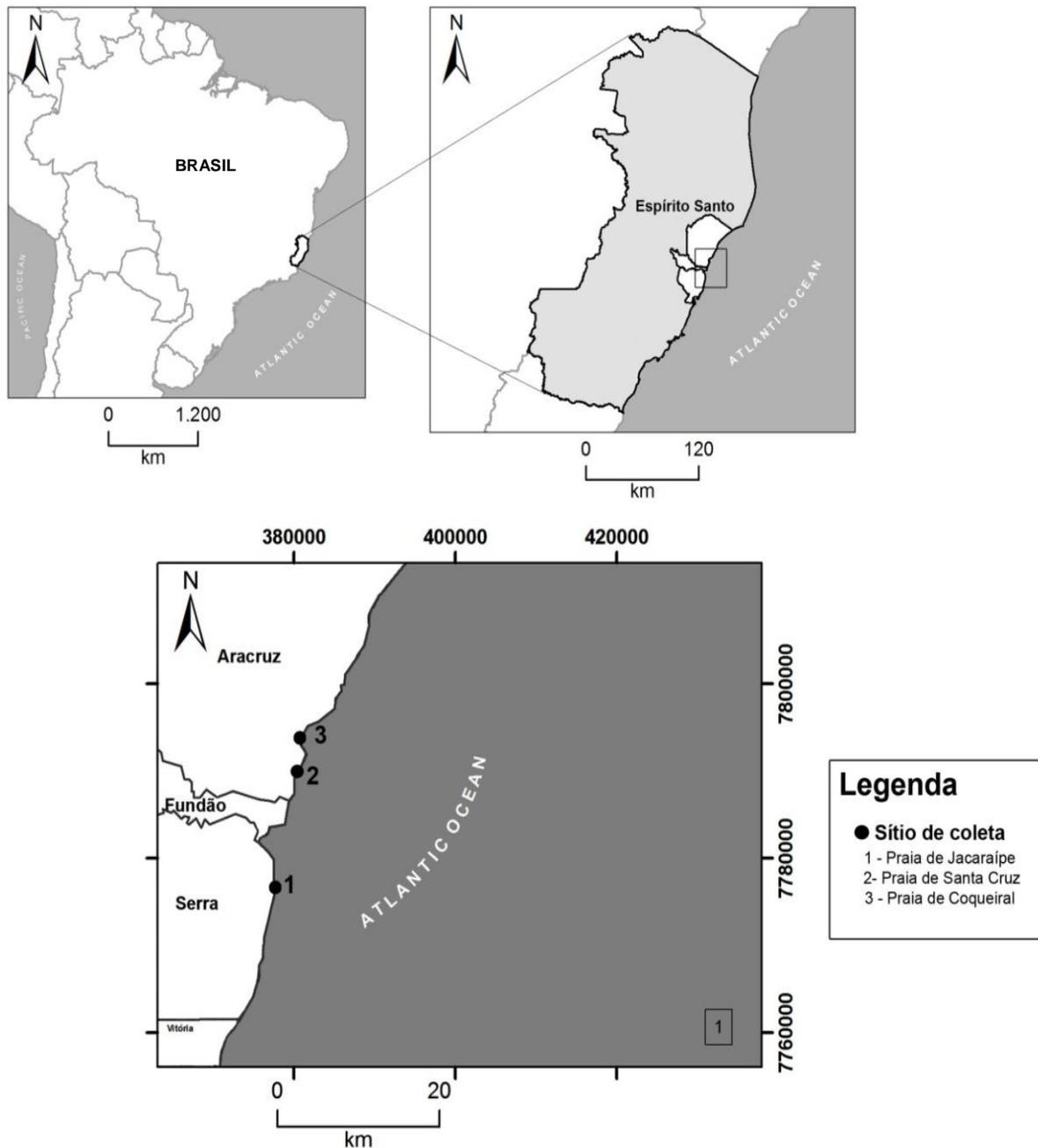
3.1 ÁREA DE ESTUDO

Para esse trabalho foram utilizados 3 estações de amostragens ao litoral centro norte do Estado do Espírito Santo para coleta de espécimes de *Leucozonia nassa*: Praia de Jacaraípe (Ponto 1), localizada entre as coordenadas 20° 06' 39" S 40° 10' 20" W, Praia Santa Cruz (Ponto 2) nas coordenadas: 19° 58' 22" S 40° 08' 17" W) e Praia de Coqueiral (Ponto 3) entre as coordenadas 19° 57' 09" S 40° 09' 16" W, sendo o Ponto 1 localizado no município de Serra, a aproximadamente 25 Km da capital, e os pontos 2 e 3 , no município de Aracruz, distante 65 km da capital do Espírito Santo, Brasil (Figura 7).

Os substratos de até 200 metros de largura presentes nessas estações de amostragem que ficam expostos durante a maré baixa de sizígia pertencem aos terraços de abrasão marinha do Grupo Barreiras (ALBINO, 2001). As praias são caracterizadas pela presença de couraças lateríticas recobertas predominantemente por biota bentônica rica em algas e corais, dispostas ao longo da zona de arrebenção, e que são responsáveis pelo desenvolvimento dos recortes litorâneos e de pequenas enseadas (OLIVEIRA, 1995). A alta produtividade biológica e transferência de energia são características deste substrato litorâneo, que destacando-o como uma fonte de produção primária capaz de criar condições favoráveis ao crescimento e reprodução de organismos de diversos táxons (MASUNARI; FORNERIS, 1981).

As 3 áreas de amostragens acham-se fora da zona de influência direta de indústrias e portos. Estudos preliminares realizados por Costa (2012) demonstraram ausência de indivíduos contaminados nas Praias Santa Cruz, de Jacaraípe e Coqueiral, caracterizando-as como sendo áreas amostrais controle, livres de contaminação por TBT.

Figura 7 - Localização das estações de amostragem ao longo do litoral centro-norte do Espírito Santo. (1) Praia de Jacaraípe. (2) Praia de Santa Cruz. (3) Praia de Coqueiral.



Fonte: Adaptado de COSTA, 2012.

Os dados levantados pelo Centro Tecnológico de Hidráulica da Universidade de São Paulo (CTH/USP) revelam que os ventos de maior frequência e intensidade advêm do noroeste e sudoeste. “Os ventos do noroeste sopram durante a maior parte do ano, enquanto os do sudoeste tem relação com as frentes frias que chegam

periodicamente à costa do Estado”. Para a região da Praia de Coqueiral, destaca-se, a existência do Rio Piraquê Açu, que oferece volumoso aporte sedimentar, que associado à presença dos terraços de abrasão da plataforma continental e baixa hidrodinâmica, refletem em características dissipativas ou intermediárias para a praia. Para esse ambiente, o processo erosivo é intensificado nos trechos dos terraços de abrasão, que recebem ação de ondas convergentes e resultam em aumento da energia praial (ALBINO, 2001).

Os dados sobre temperatura da água do mar, altura e período das ondas obtidas pelo INPH (Instituto Nacional de Pesquisas Hidroviárias) entre março de 1979 a setembro de 1980 descrevem que a altura das ondas para o litoral capixaba não ultrapassam 1,5 metro e tem período frequente oscilando entre 5 e 11,5 segundos, caracterizando-o como micromaré, e que a superfície da água do mar sofre pouca variação entre inverno e verão, em torno de 27 a 30°C (ALBINO, 2001).

3.2 ESCOLHA E DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

Leucozonia nassa (Gmelin, 1791) (Figura 8) mostrou ser uma boa espécie bioindicadora da poluição por TBT na costa do Espírito Santo por apresentar-se altamente sensível à exposição crônica por esse poluente, registrando elevados índices de imposex em fêmeas e anomalias em pênis de machos, principalmente em regiões próximas a portos e marinas. Tal fator, associado à facilidade de coleta de exemplares, à presença de grandes populações e sua ampla distribuição ao longo do litoral brasileiro, a selecionam como uma possível espécie sentinela para a presença desses compostos, podendo ser adotada em programas de biomonitoramento em outras regiões (PEDRUZI, 2009; COSTA, 2012).

L. nassa é um neogastrópode representante da família Fasciolariidae. Esta família é habitante de praias rasas tropicais, e ocupa zonas entre marés, seus representantes são carnívoros, usualmente predadores de outros gastrópodes como *Cymatium atratum*, bivalves, como *Perna perna*, poliquetas, ostras e cracas. (MATTHEWS et al., 1989; RIOS, 1994; TAYLOR, J; MORRIS; TAYLOR, C., 1980).

Figura 8 - Exemplar de *Leucozonia nassa*

Fonte: Arquivo próprio. (2013)

O gênero *Leucozonia* (Gray, 1847) é representado no Brasil por *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791), *L. Ocellata* (Gmelin, 1791) e *L. ponderosa* (VERMEIJ; SNYDER, 1998). *Leucozonia ponderosa* é endêmica da Ilha da Trindade, no Espírito Santo, enquanto que *Leucozonia nassa* e *L. ocellata* são mais amplamente distribuídas sobre a plataforma continental do Brasil (VERMEIJ; SNYDER, 1998, 2002).

Leucozonia nassa tem ocorrência descrita em estados do "Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Bahia, Rio de Janeiro e Santa Catarina [...]" (THOMÉ, 2010, p. 127; RIOS, 1994, p. 1053) bem como [...] nas "ilhas oceânicas brasileiras de Trindade, Atol das Rocas e Fernando de Noronha" (THOMÉ, 2010, p. 127; RIOS 1994, p. 1053; MATTHEWS et al., 1889, p. 362; VERMEIJ; SNYDER, 2002, p.27; COUTO; PIMENTA, 2012, p. 104).

Alguns autores também descrevem a ocorrência de *Leucozonia nassa* em regiões de países como "Texas, Colômbia, Venezuela" (RIOS, 1994; THOMÉ, 2010), assim como:

Nos Estados Unidos, do Norte de Carolina até a Flórida; Ilhas Caribenhas como Bahamas, costa norte de Cuba, costa sul de Hispaniola e Jamaica; leste do Caribe a partir de porto Rico, Trinidad e Barbados; estados mexicanos como Veracruz, Campeche, e região ocidental de Quintana Roo (VERMEIJ; SNYDER, 2002, p. 27; COUTO; PIMENTA, 2012, p. 104)

Leucozonia nassa apresenta como características anatômicas externas principais: tamanho da concha de aproximadamente 69 mm com aparência ovalada e fusiforme e coloração marrom alaranjado a marrom escuro, dotada de abertura de formato

ovóide, nódulos bem marcados a não muito acentuados no ombro, lábio columelar com três a quatro pregas proeminentes próximas à base, linha espiral clara terminando no espinho do lábio externo, pé pequeno, canal sifonal anterior curto, canal posterior aberto, opérculo córneo marrom escuro, manto fino e transparente, e corpo de coloração rosada com manchas brancas (RIOS, 1994; MATTHEWS et al., 1889; VERMEIJ; SNYDER, 2002).

Segundo Couto e Pimenta (2012, p. 108), as fêmeas de *Leucozonia nassa* possuem o sistema reprodutor constituído das seguintes características:

As fêmeas apresentam ovário de cor vermelho intenso, que ocupa todos os espirais de massa visceral em torno do ápice e todo o comprimento do aparelho digestivo e da glândula digestiva; glândula de cápsula grande com padrões distintos de cor e textura, que se abre por meio da abertura genital; um pequeno recipiente seminal com uma superfície granular localizado entre o albúmen e a glândula da cápsula; e uma estrutura sacular localizada no dorso, anteriormente à abertura do gonóporo.

Os mesmos autores citados acima descreveram o sistema reprodutivo dos machos de *L. nassa*, como sendo dotado de:

Testículos com posição, formato e coloração semelhantes ao ovário, em fêmeas; vaso deferente [...] estreito e simples que corre ao longo da parede ventral do rim, conectando-se com a próstata; próstata alongada, fina e localizada ao longo do lado direito do teto da cavidade palial, próximo ao reto [...]; pênis alongado, largo na base e sub-circular, que torna-se abruptamente mais estreito na altura mediana, terminando em uma longa e fina extensão, remontando para o interior da cavidade palial.

3.3 COLETA DOS ESPÉCIMES

O presente estudo se iniciou com coletas de exemplares de *Leucozonia nassa* promovidas em maio de 2013. As coletas foram realizadas manualmente ou com auxílio de pinças, por exploração em substratos rochosos no infralitoral, durante a maré baixa. Os animais foram acomodados em frascos plásticos contendo água do mar e encaminhados ao laboratório da Base Oceanográfica da Universidade Federal do Espírito Santo.

Por se tratarem de animais que não apresentam dimorfismo sexual aparente, os organismos foram capturados indiscriminadamente, e a sexagem foi feita a partir da narcose dos exemplares. Foram coletados 79 indivíduos nas praias de Jacaraípe e Santa Cruz (Pontos 1 e 2) e 432 na Praia de Coqueiral (Ponto 3), totalizando 511 exemplares. Destes, 287 eram fêmeas, e apenas estas foram submetidas à indução laboratorial de imposex.

Para a execução deste trabalho, foram analisados apenas exemplares fêmeas de *L. nassa*, de tamanho juvenil (de tamanho inferior à 40 mm de comprimento, considerando a ponta da espira até a extremidade do canal sifonal) e adulto (tamanho superior a 40 mm).

3.4 DETERMINAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL

A razão sexual foi determinada de acordo com Birchernough e outros (2002) a partir da equação:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de machos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de fêmeas}}$$

Para os resultados obtidos desta expressão, assumiu-se valores menores que 1 como sendo desvio na razão sexual para fêmeas e valores maiores que 1, desvio para machos.

Segundo Fernandez e outros (2007), o N amostral baixo e a desregulação endócrina são fatores que podem exercer influências sobre a variabilidade nas razões sexuais de uma população, uma vez que o N amostral baixo pode suprimir ou expandir a variação para determinado sexo nas razões encontradas em campo.

3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

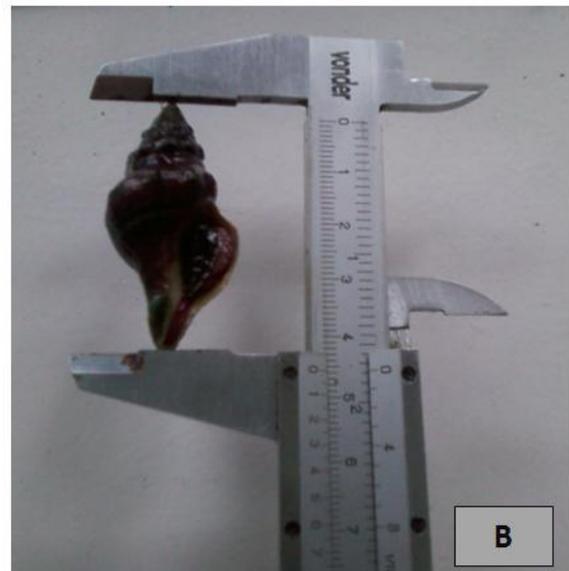
Para o seguinte trabalho, foram realizados procedimentos laboratoriais que envolveram desde a narcose dos organismos, medidas morfométricas, aclimatação, manutenção de aquários, indução por água contaminada, e remoção de conchas dos exemplares de *L. nassa*.

3.5.1 Sexagem e medidas morfométricas

Os 511 espécimes de *L. nassa* foram imersos em uma solução anestésica de proporção 1:1 contendo Água do mar + água destilada e Cloreto de Magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 4%. O completo relaxamento dos exemplares, demonstrada pela prostração do pé e ausência de resposta ao toque ocorreu ao final

de aproximadamente 30 minutos de exposição ao anestésico, e os animais puderam então ser sexados pelo procedimento de puxamento do opérculo (Figura 9A) até que seja possível a visualização da entrada da cavidade palial, podendo constatar a presença ou ausência do pênis e vaso deferente. Após a análise, foram realizadas as medidas morfométricas da concha da ponta da espira até a extremidade do canal sifonal dos animais fêmeas, com auxílio de paquímetro manual Vonder (0,5 mm de precisão) (Figura 9B). Posteriormente as fêmeas foram separadas pela classe de tamanho, em juvenis (tamanho da concha inferior à 40 mm de comprimento) e adultas (tamanho superior a 40 mm), e acomodadas em aquários, sob aeração constante até a completa recuperação da anestesia, quando voltam a se locomover e se prendem firmemente à parede do aquário. Os exemplares machos que também foram depositados em aquário, após a recuperação do procedimento anestésico foram devolvidos às mesmas áreas onde foram coletados, e as fêmeas, mantidas em aquários para aclimatação.

Figura 9 - Processos iniciais de separação dos organismos quanto ao sexo e classe de tamanho. **A)** Procedimento de puxamento do opérculo de *Leucozonia nassa* para determinação do sexo. **B)** Medidas morfométricas da concha.



Fonte: Arquivo próprio. (2013)

3.5.2 Aclimação

Após a seleção das fêmeas, as mesmas passaram por um período de aclimação de duas semanas em laboratório sob condições controladas. As 287 fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em 10 aquários de plástico, com 20L de água com salinidade 32 ± 1 mantidos a uma temperatura de $25^{\circ} \pm 2$, e expostos a um fotoperíodo natural (12:12, claro:escuro). Os animais foram mantidos em aquários aerados (Figura 10) e receberam alimentação viva à base de *Tegula viridula* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Gastropoda: Trochidae), coletadas na Praia de Coqueiral (Ponto 3), até o momento das análises.

Figura 10 – Aquários utilizados no processo de indução laboratorial de imposex em *L. nassa* no presente estudo.



Fonte: Arquivo próprio. (2013)

3.5.3 Utilização do TBT

O contaminante apresentava-se em concentração estoque de 96% e foi diluído em álcool etílico a fim de se obter solução mãe de $500 \mu\text{g TBTL}^{-1}$. Duas vezes por semana, a água dos aquários era renovada e recontaminada pela adição de 2 ml da concentração mãe de TBT em cada aquário (Figura 11), de maneira a se obter uma concentração final de $5 \mu\text{g TBTL}^{-1}$. O tratamento estabelecido seguiu a metodologia utilizada por Abidli e outros (2012).

Os espécimes foram distribuídos em 10 aquários, sendo 2 destes direcionados para tratamento controle (concentração zero de TBT - água não contaminada) e os demais receberam água contaminada por TBT à concentração de $5\mu\text{g TBTL}^{-1}$.

Figura 11 – Procedimento de contaminação da água dos aquários a partir da adição de 2 ml de TBT da concentração mãe.



Fonte: Arquivo próprio. (2013)

3.5.4 Manutenção dos aquários

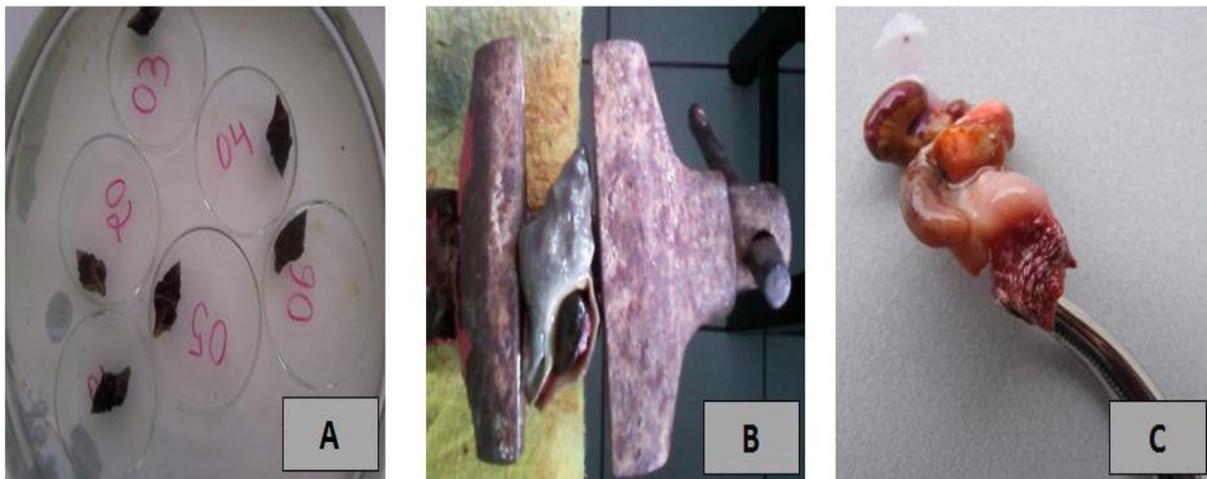
Foi realizada a manutenção dos aquários 2 vezes por semana. Durante esse processo, os exemplares mortos de *Tegula viridula* eram retirados dos aquários e descartados, e os exemplares de *L. nassa*, depositados em potes plásticos pra que os aquários fossem lavados. Finalizada essa etapa, os exemplares de *L. nassa* eram novamente colocados nos aquários com 20 litros de água recontaminada, pela adição da solução mãe de TBT.

A água utilizada nos aquários foi obtida na Base Oceanográfica da Universidade Federal do Espírito Santo, sendo esta coletada na Praia de Coqueiral – Aracruz/ES por meio de bomba de captação, filtrada e exposta à radiação UV.

3.5.5 Anestesia e remoção de conchas

Quinzenalmente, um grupo de 5 animais juvenis e 5 animais adultos eram selecionados dos aquários para serem analisados. Após a narcotização (Figura 12 A) as conchas foram quebradas com o auxílio de uma morsa (Figura 12B) e removidas para realizar o estudo das partes moles (Figura 12C) e detectar possíveis alterações morfológicas no sistema reprodutor. Esse processo foi repetido por 4 vezes, de forma que o último grupo tivesse sua análise completada ao final de 60 dias.

Figura 12 - Procedimentos prévios à análise de imposex. **A)** Imersão dos exemplares de *L. nassa* em substância anestésica para narcotização. **B)** Quebra da concha com morsa para exibição das partes moles do animal. **C)** Animal desconchado para diagnóstico de imposex



Fonte: Arquivo próprio. (2013)

3.5.6 Análise de imposex

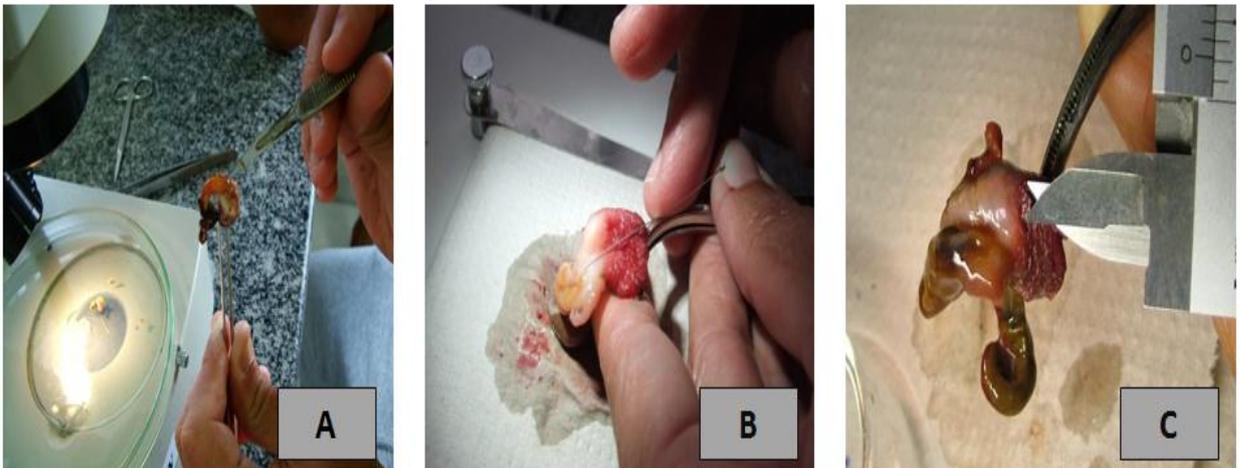
Foi realizada a abertura da cavidade palial dos exemplares com auxílio de bisturi e as partes moles foram analisadas a partir de estereomicroscópio, para melhor visualização dos caracteres (Figura 13A).

Para determinar os diferentes níveis de imposex foram utilizados os seguintes índices: I% (Porcentagem de fêmeas imposexadas), proposto por Gibbs e Bryan (1987), VDSI (Índice da sequência do vaso deferente) e a escala de seis estágios proposta por Gibbs e Bryan (1994).

Seguindo a metodologia utilizada por Pedruzzi *et al.* (2009), para verificar a condição da vulva, se aberta ou fechada, foi utilizado um alfinete entomológico Nylon Heads Papillon Nº 00, o qual foi introduzido cuidadosamente no poro gonodal das fêmeas permitindo a melhor observação da sua condição (Figura 13B) O pênis das fêmeas imposexadas foi medido com auxílio de paquímetro manual (Figura 13C).

As partes moles utilizadas para o estudo, após as análises, foram conservadas em álcool 70% e acham-se depositadas na coleção malacológica do Laboratório de Malacologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Figura 13 - Procedimentos de análise de imposex. **A)** Abertura da cavidade palial. **B)** Inserção de alfinete entomológico no poro gonodal. **C)** Realização da medida do comprimento do pênis de *L. nassa*



Fonte: Arquivo próprio. (2013)

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram testados quanto à normalidade (considerou-se $\alpha = 0,05$) e posteriormente, os valores do comprimento do pênis da fêmea (CPF) foram comparados entre os períodos de análise (15, 30, 45 e 60 dias), a maturação sexual (juvenil e adulto) e a sequência de desenvolvimento do vaso deferente (VDSI) pelo teste não paramétrico de Kruskal- Wallis, com significância de 0,05, utilizando-se o *software* Statistic 8.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

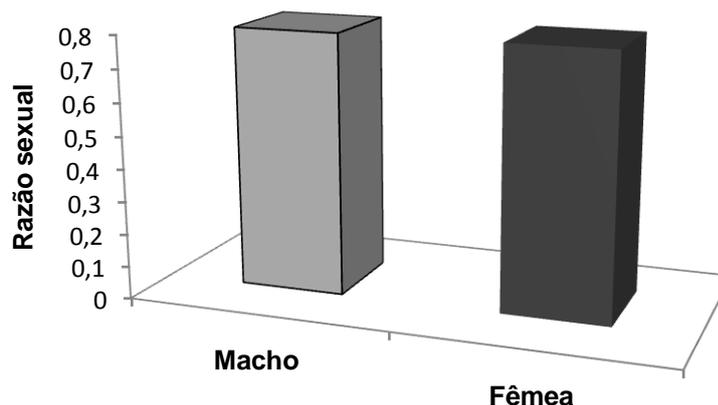
Neste capítulo estão dispostos os valores obtidos a partir do cálculo de razão sexual e da aplicação dos índices de imposex, bem como suas respectivas discussões.

Os resultados apresentados abaixo referem-se aos indivíduos de *Leucozonia nassa* que foram submetidos à tratamentos com água contaminada por TBT. Os animais coletados em área livre de contaminação por COE's e que receberam tratamento controle não desenvolveram qualquer alteração no seu trato reprodutivo, como esperado.

4.1 RAZÃO SEXUAL

Nas áreas controles foram coletados 511 animais, sendo 287 fêmeas normais e 224 machos. A razão sexual encontrada foi de 0,78 indicando desvio para fêmeas, de acordo com Bichernough e outros (2002), o qual prevê que valores menores que 1 indicam um desvio para fêmeas em uma população. Os valores encontrados para a razão sexual de *L. nassa* estão apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1 - Valores encontrados para a razão sexual em uma população de *Leucozonia nassa* coletada em áreas de referência.

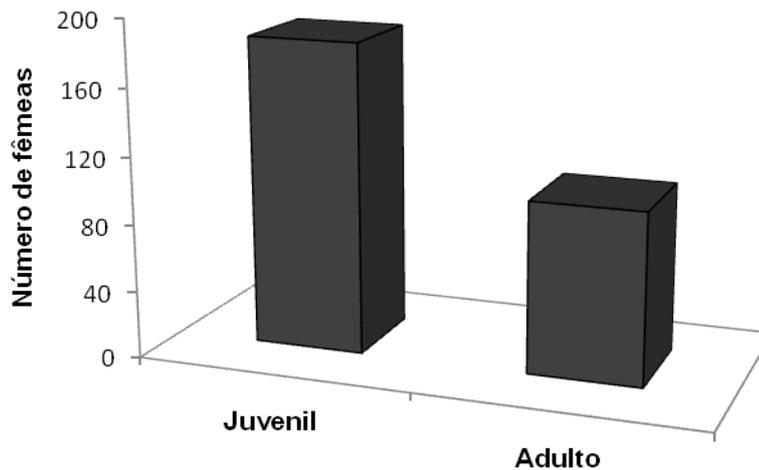


Fonte: Elaboração própria. (2013)

Em relação ao número total de fêmeas de *Leucozonia nassa* coletadas, 185 destas eram juvenis e 102 adultas (Gráfico 2). A diferença nos valores quanto à classe de tamanho, com representação de \underline{n} de adultos superior ao \underline{n} de juvenis pode estar

relacionado com a observação de posturas nas estações durante as coletas, evidenciando a possibilidade de recolonização da área por novos organismos da espécie, de forma a contribuir para o estabelecimento da população mais jovem.

Gráfico 2 – Diferenças no número de fêmeas de *Leucozonia nassa* coletadas em relação à classe de tamanho.



Fonte: Elaboração própria. (2013)

Em 2009, Pedruzzi e outros realizaram trabalhos referentes à determinação da razão sexual de *L. nassa* nos mesmos sítios de coleta do presente trabalho e constataram que naturalmente, o número de fêmeas era maior que o de machos na população local, e por se tratar de uma zona livre de contaminação por COE's, as fêmeas não apresentavam indícios de desenvolvimento de caracteres masculinos. Pedruzzi e outros registraram a razão sexual de *L. nassa* para áreas controle, analisando 65 exemplares pelo método não destrutivo, e indicou a ocorrência de 22 machos e 43 fêmeas normais, atribuindo frequência M:F de 0,51.

No estudo desenvolvido por Pedruzzi e outros (2009), a maioria das estações amostrais localizadas em porções próximas a fontes de atividades navais, apresentaram um aumento no percentual de machos. Resultados semelhantes foram apresentados por Gibbs e Bryan (1987) no Canadá, e por Costa e outros (2012) no litoral do Espírito Santo. Em 2009, Costa registrou razão sexual de 0,52 para a Praia de Coqueiral, e posteriormente em 2012, para a mesma área e índice, encontrou valor de 0,50 (COSTA, 2012). Para 2009 e 2012 os registros de razão sexual evidenciaram desvio para fêmeas, e um número reduzido de machos, quando

comparado ao estudo realizado por Pedruzzi e outros (2009) para a mesma área amostral supracitada.

No presente estudo verificou-se aumento significativo no número de exemplares fêmeas para as áreas de estudo, quando comparado a resultados de Costa (2012) para Coqueiral em 2007 e 2012, e Pedruzzi e outros (2009) para as praias de Coqueiral, Santa Cruz e final da praia de Jacaraípe, tratadas aqui. Tal fator pode ser atribuído à não separação e contabilidade individual dos organismos coletados em cada uma das estações de amostragem, havendo possibilidade de um possível desnível na população para machos ou para fêmeas de uma (ou mais) delas, acarretar na alteração dos resultados gerais das 3 áreas.

É importante ter conhecimento a respeito da distribuição da razão sexual dos organismos, pois a partir dos registros precedentes associados ao desenvolvimento de novos estudos sobre a população de *L. nassa*, pode-se obter um monitoramento rápido à cerca da contaminação por COE's em áreas impactadas e controles e a sobrevivência e distribuição da espécie para estes locais.

4.2 TAXA DE MORTALIDADE

Quanto à taxa de mortalidade dos indivíduos, houve queda no número de mortes ao longo dos períodos de experimento, com ocorrência de 110 animais mortos na primeira quinzena, 60 na segunda e não mais sendo registradas mortes para o 3º e 4º períodos. A maior queda no número de representantes se deu para organismos juvenis (Tabela 4), provavelmente em função da maior sensibilidade que podem apresentar à exposição ao contaminante. Pesquisadores que trabalham com imposex em espécies como *Buccinum undatum*, *Nucella lapillus* e *Hinia reticulata*, relatam a ocorrência da síndrome em estágios de vida diferentes, atribuindo maior sensibilidade aos juvenis por não possuírem aparelho reprodutor completo neste estágio de vida, bem como, registram contaminação em fêmeas sexualmente maduras apenas quando expostas à concentrações relativamente altas de TBT (MENSINK et al; 2002; OEHLMANN, 1994; STROBEN, 1994). Para intersex, Bauer e outros (1997) elucidam que a contaminação por TBT só seria viável para fêmeas juvenis e sexualmente imaturas de *Littoraria angulifera*, em contraposição à

resultados de Van den Broeck e outros (2009) *apud in* Costa (2012), que observou fêmeas adultas e imposexadas em locais severamente afetados por TBT.

Santos e outros (2005) relatou mortalidade de 7% para *N. lapillus* tratadas com TBT a 50 ng TBT L⁻¹, como para tratamentos de grupos controle. As observações de Abidli e outros (2012) sugerem que o TBT concentrado a 5 e 50 ng TBT L⁻¹ não tem efeitos nas taxas de mortalidade após 2 meses de exposição para *H. trunculus* e *B. brandaris*. No presente estudo, a taxa de mortalidade de *L. nassa* foi bastante alta, registrando 59,23%, com efeito reduzido a partir do 45º dia de indução.

Tabela 4 - Taxa de mortalidade dos exemplares de *Leucozonia nassa* ao longo dos períodos de análise.

Período de Análise	Tamanho	Mortalidade
15 DIAS	Juvenil	83
15 DIAS	Adulto	27
30 DIAS	Juvenil	41
30 DIAS	Adulto	19
45 DIAS	Juvenil	0
45 DIAS	Adulto	0
60 DIAS	Juvenil	0
60 DIAS	Adulto	0
Total		170

Fonte: Elaboração própria. (2013)

Ao total, 117 indivíduos de *L. nassa* foram analisados, sendo 84 deles direcionados para tratamento por contaminação de água. Houve seleção de 10 exemplares para a maioria das análises quinzenais, com exceção para o 45º e 60º dias, que tiveram 15 e 9 juvenis analisados, respectivamente. A variação para o número de exemplares entre as análises está relacionada à sobrevivência dos organismos nos aquários. Considerando a taxa de mortalidade, ao 45º dia de experimento, restavam 15 animais juvenis para quantificação do imposex e demais parâmetros, e ao 60º, restaram 10, sendo um deles macho. Por erro de sexagem inicial, este exemplar manteve-se entre as fêmeas nos aquários e posteriormente, foi retirado da contagem. O comprimento do pênis do macho em questão não foi mensurado.

4.3 ÍNDICE DE IMPOSEX E VDSI

Os dados atribuídos ao índice de imposex (I%), comprimento do pênis da fêmea (CPF) e sequência de desenvolvimento do vaso deferente (VDSI) dos 4 períodos de análise dos animais adultos e juvenis de *Leucozonia nassa* estão apresentados na tabela 5.

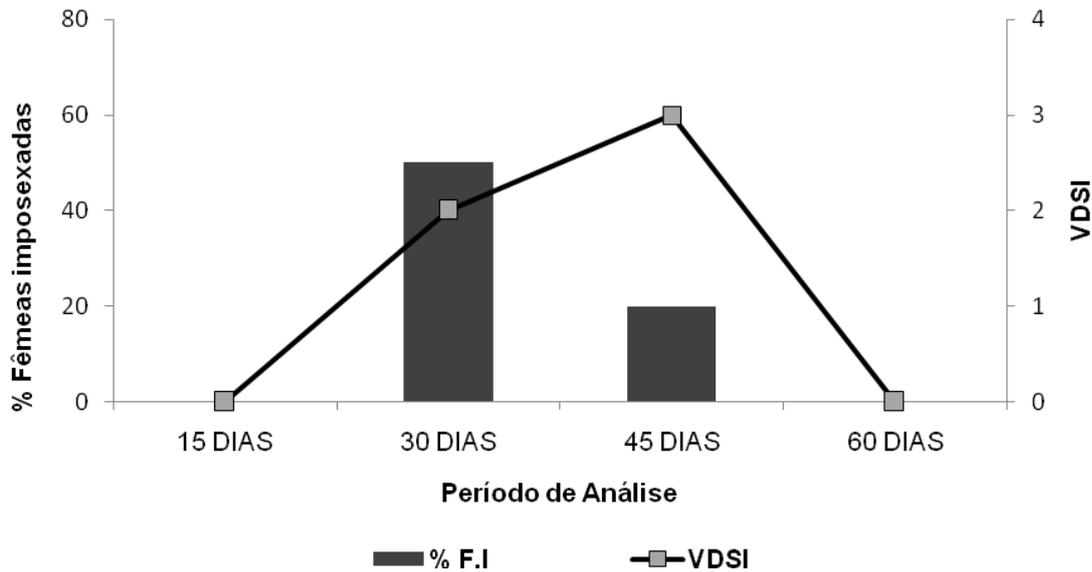
Tabela 5 - Classe de tamanho e quantificação de exemplares e valores de I%, CPF, VDSI para *Leucozonia nassa* analisados ao longo dos períodos de experimentação. I%: índices de imposex. CPF: comprimento do pênis da fêmea. VDSI: Sequência de desenvolvimento do vaso deferente.

Período de Análise	Tamanho	Nº exemplares Analisados	de I%	CPF (mm)	VDSI
15 DIAS	Juvenil	10	30	0,11	3
15 DIAS	Adulto	10	0	0	0
30 DIAS	Juvenil	10	60	0,05	2
30 DIAS	Adulto	10	50	0,05	2
45 DIAS	Juvenil	15	27	1	3
45 DIAS	Adulto	10	20	7,9	3
60 DIAS	Juvenil	9	44,44	2,5	0,51
60 DIAS	Adulto	10	0	0	0

Fonte: Elaboração própria. (2013)

A percentagem de imposex (I%) para fêmeas adultas de *Leucozonia nassa* variou de 0 a 50%, enquanto que a média da sequência de desenvolvimento do vaso deferente (VDSI) variou do estágio 0 a 3 ao longo dos 4 períodos de exposição à água contaminada. Os dados obtidos para 15 e 60 dias mostram a correlação entre os valores I% e os valores médios de VDSI, apresentados como 0 (Gráfico 3), evidenciando que as fêmeas adultas analisadas nestes períodos quando não apresentavam pênis ou pré pênis, também não apresentaram desenvolvimento de VD. Em relação ao I% de fêmeas adultas, registrou-se aumento linear até os 45 dias, quando houve queda abrupta seguida de registro 0 de imposex para os exemplares analisados ao período final do experimento. Para o 45º dia, observou-se queda no número de fêmeas imposexadas, entretanto o valor do VD foi o maior registrado para adultas ao longo de todo procedimento.

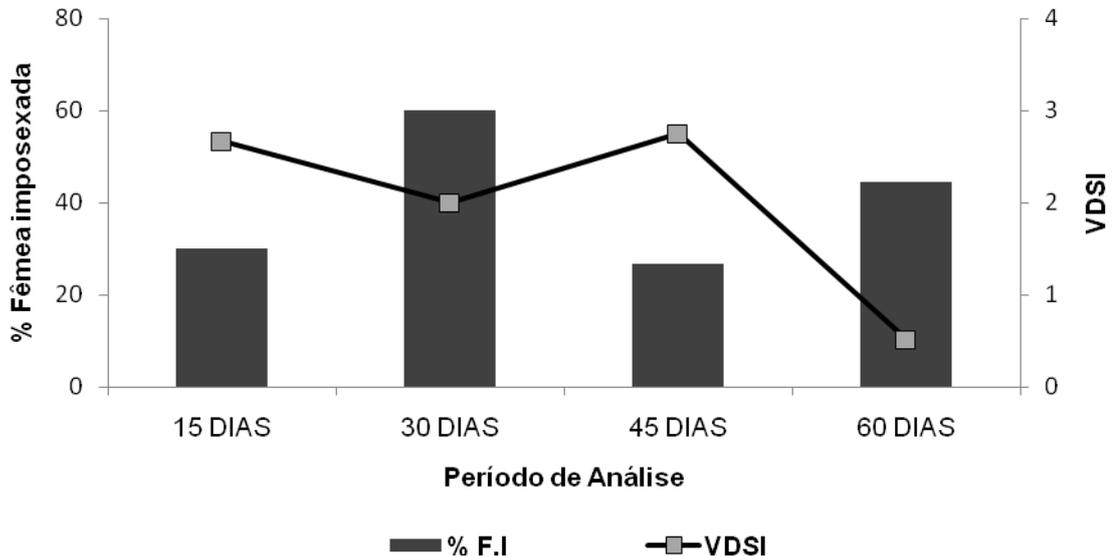
Gráfico 3 - Percentagem de imposex (I%) e valores médios de VDSI obtidos para fêmeas adultas de *Leucozonia nassa* em relação ao tempo de exposição ao contaminante



Fonte: Elaboração própria. (2013)

Para organismos juvenis, a percentagem de imposex variou de 30 a 60%, e para o VDSI obteve-se uma variação entre 0,51 e 3 (Gráfico 4). O tratamento apresentou duas etapas de queda para VDSI no 2º e 4º períodos de exposição, com o menor registro ao 60º dia. Quanto ao I%, registrou-se o dobro de imposex para as fêmeas do 2º período, em relação ao primeiro, seguido da maior queda para este índice ao longo de todo o tratamento ao 45º dia, observando ao final do 4º período, um aumento para em torno de 40%. Ao início e ao 3º período de tratamento, observou-se variação entre o I% e o VDSI, evidenciando que as fêmeas imposexadas desenvolveram VD de estágio 3, o maior observado para todos os períodos de tratamento com juvenis. A discrepância nos valores de VDSI e I% devem levar em consideração, em se tratando de nível de contaminação, principalmente o desenvolvimento do VD, pois segundo Bauer e outros (1997) este parâmetro é mais confiável que o próprio I%, uma vez que permite avaliar a porcentagem de esterilidade das fêmeas em função da obstrução da vulva pelo desenvolvimento do vaso.

Gráfico 4 - Percentagem de imposex (I%) e valores médios de VDSI obtidos para fêmeas juvenis de *Leucozonia nassa* em relação ao tempo de exposição ao contaminante

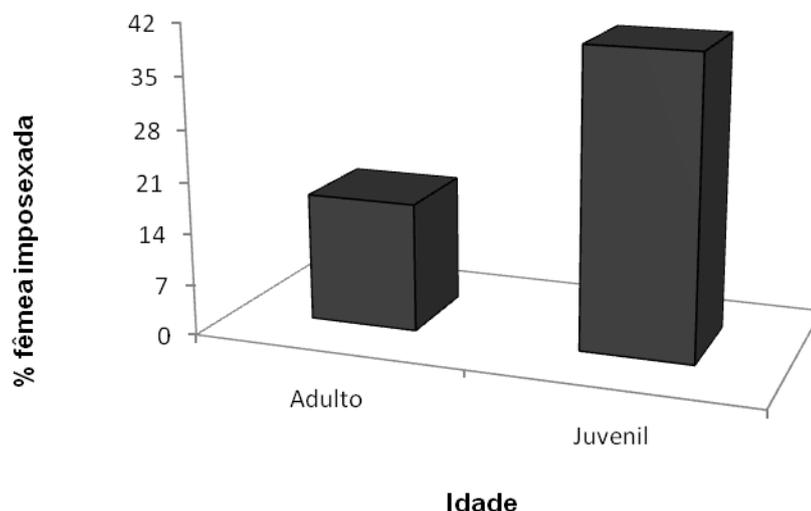


Fonte: Elaboração própria. (2013)

Para todo o experimento, os maiores valores de percentagem de imposex foram encontrados ao 30º dia de indução, tanto para organismos juvenis quanto adultos, determinando I% de 60 e 50%, respectivamente. Quanto à taxa de imposex para o experimento, constatou-se o valor médio de 40,27% para fêmeas juvenis e 17,5% para adultos (Gráfico 5).

Com a diferença entre os resultados de I% para juvenis e adultos, reforça-se a possibilidade de maior sensibilidade de indivíduos juvenis, corroborada também pelo desenvolvimento do VD no estágio III em dois períodos, e pela ausência de valores 0 para ambos os parâmetros ao longo da pesquisa. O menor valor de I% registrado foi de 0% para adultos na análise de 15 dias, e tal unidade voltou a se repetir para a mesma classe de tamanho ao 60º dia. Em função do valor do índice de imposex ser 0% e as fêmeas não apresentarem pênis ou vaso deferente para serem mensurados, pode-se afirmar que os exemplares adultos utilizados para estes períodos (1º e 4º período de análises) não foram afetados pela síndrome (Figura 14).

Gráfico 5 – Média da percentagem de fêmeas adultas e juvenis imposexadas ao final do experimento



Fonte: Elaboração própria. (2013)

O conhecimento de organismos adultos não imposexados e sem desenvolvimento de VD, quando submetidos ao tratamento com TBT por 60 dias pode ser supostamente justificado pela maior resistência da população ao contaminante. Se trata apenas de uma suposição, pois o levantamento genotípico expresso em características resistentes para a população quanto ao contaminante não foi estudada ao longo desta pesquisa.

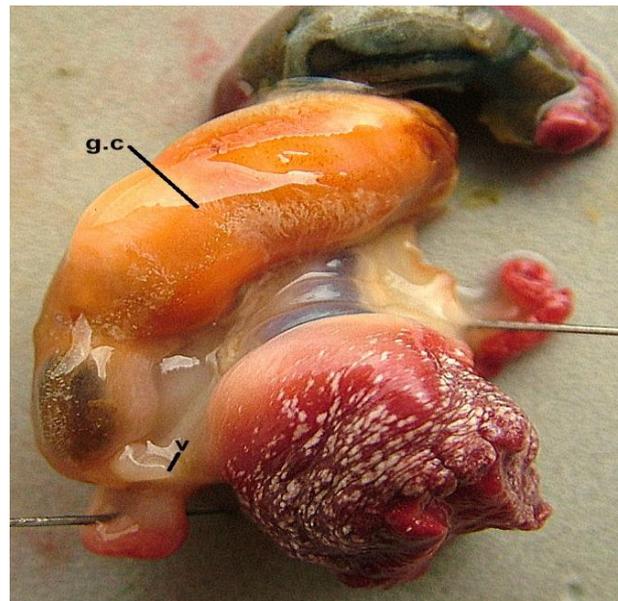
Os valores de I% para *L. nassa* obtidos no presente trabalho foram altos quando comparados com os valores de Abidli e outros (2012) para *Hexaplex trunculus* e *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae), pois os testes estatísticos não conseguiram detectar um efeito significativo na proporção de fêmeas imposexadas para tratamento com $5\mu\text{g TBTL}^{-1}$. O autor supracitado registrou aumento significativo na intensidade do I% para *Hexaplex trunculus* e *Bolinus brandaris* expostos a tratamento de dois meses ao TBT a $50\mu\text{g TBT L}^{-1}$, com obtenção de índice de imposex maior em *H. trunculus*, embora as diferenças entre as espécies não fossem significativas.

No trabalho de Abidli e outros (2012), a incidência de imposex aumentou em *H. trunculus* e *B. brandaris* após exposição ao TBT, entretanto, diferenças estatisticamente significativas não foram registradas para maturidade de fêmeas e

machos em todos os tratamentos (5 e 50 μg TBT L⁻¹ para 15, 30, 45 e 60 dias). Os dados deste autor são corroborados por Ramón e Amor (2001), que detectou fêmeas de *B. brandaris* exibindo sinais de imposex e machos com anomalias nas gônadas, sem que a reprodução fosse prejudicada.

Em *Nucella lapillus* exposta à 50ng TBT L⁻¹, Santos e outros (2005) mostrou elevação do índice de imposex de 20 para 50% em 3 meses. Em *Buccinum undatum*, Mensink e outros (2002) detectou aumento de imposex de 0 para 54% após 8 meses de exposição com 100 ng TBT L⁻¹. Essas observações indicam *Leucozonia nassa* como uma espécie altamente sensível à contaminação por TBT, por apresentar resultados em curto espaço de tempo, principalmente para organismos juvenis.

Figura 14 – Exemplar adulto desconchado de *Leucozonia nassa* não imposexado analisado ao 60º dia do experimento. gc: glândula de cápsula; v: vulva.



Fonte: Elaboração própria. (2013)

Os valores de VDSI e CPF tiveram sua normalidade testada em relação ao período de tratamento, à idade dos exemplares e ao período x idade (Tabela 6). O gráfico 6 evidencia que houveram diferenças significativas à partir da correlação do desenvolvimento do VD com a idade dos exemplares.

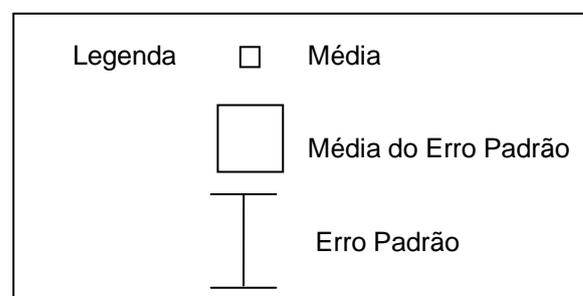
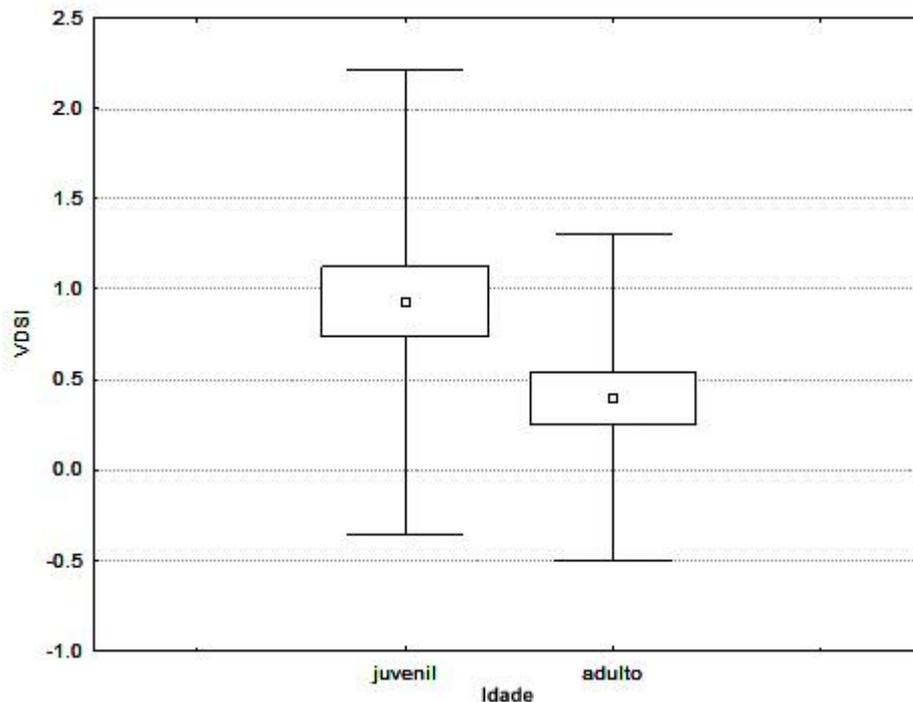
Abidli e outros (2012) não registrou efeito significativo do TBT com referência à maturidade dos indivíduos de *Hexaplex trunculus* e *Bolinus brandaris* para os tratamentos usando 5 e 50 μg TBT L⁻¹

Tabela 6 - Resultados do teste de Kruskal-Walis utilizando o índice de VDSI e CPF entre os períodos de análise e a idade de *Leucozonia nassa*. p: probabilidade associada ao valor do teste.

Variável	Fonte de Variação	Grau de Liberdade	de Valor do teste	p
VDSI	Período	3		>0,05
	Idade	1	4,73	0,02
CPF	Período	3	10,62	0,01
	Idade	1		>0,05

Fonte: Elaboração própria. (2013)

Gráfico 6 – Valores médios (\pm desvio padrão) do desenvolvimento do vaso deferente (VDSI) em relação ao estágio de vida (juvenil e adulto) dos espécimes de *Leucozonia nassa* ($p=0,02$)

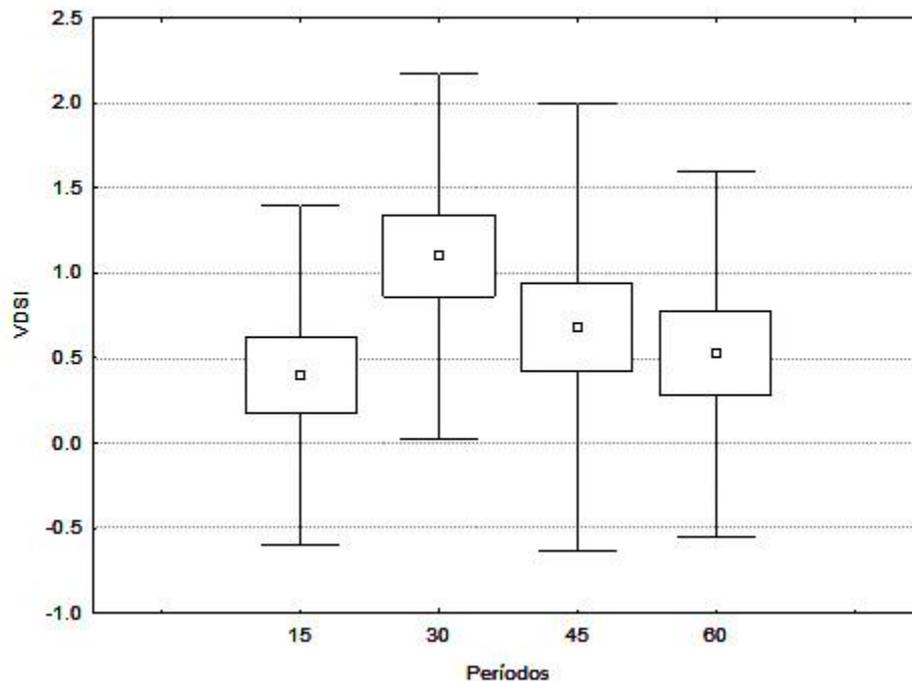


Fonte: Elaboração própria. (2013)

Os períodos em que se obtiveram maiores valores para VDSI foram 15 e 45 dias, e para CPF, 45 e 60 dias, entretanto, o tratamento estatístico evidenciou que quanto

ao desenvolvimento do VD, os períodos de análise de 15, 30, 45 e 60 dias não apresentaram diferença significativa entre si ($p>0,05$) (Gráfico 7)

Gráfico 7 – Valores médios (\pm Desvio Padrão) para desenvolvimento de vaso deferente em fêmea imposexada de *Leucozonia nassa* em relação aos períodos de análise de contaminação.



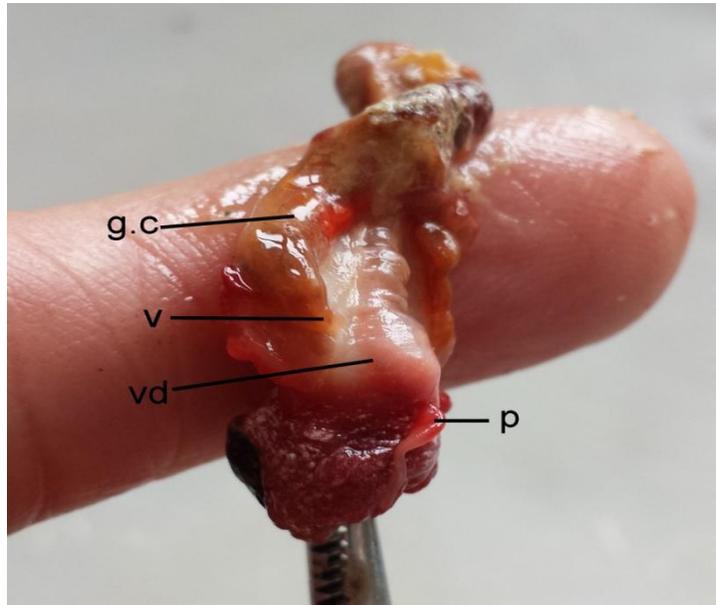
Fonte: Elaboração própria. (2013)

4.4 COMPRIMENTO DO PÊNIS

Em relação ao comprimento do pênis das fêmeas (CPF) adultas imposexadas de *Leucozonia nassa*, as médias dos valores oscilaram entre 0 e 7,9 mm, com apresentação do maior valor na terceira análise (45 dias), enquanto que para as fêmeas juvenis ocorreu variação entre 0,05 e 2,5 mm, com o maior valor ao 60º dia do experimento (Tabela 01).

Tal discrepância entre os valores obtidos do CPF de fêmeas adultas aos 45 dias em relação aos demais períodos de análise pode ser justificada pelo registro de uma fêmea imposexada com pênis de 13,4 mm de comprimento (Figura 15). Inicialmente, por se tratar de um organismo com pênis muito grande, julgou-se que o exemplar seria um macho, mas após a abertura da cavidade palial, pode-se verificar a presença de glândula de cápsula, receptáculo seminal e do vestíbulo, estruturas determinantes para sua classificação como fêmea.

Figura 15- Exemplar adulto imposexado de *Leucozonia nassa com* pênis de 14,3 mm e VD estágio 3 analisado ao 45º dia de experimento. gc: Glândula de cápsula; v: Vulva; vd: Vaso deferente; p: Pênis

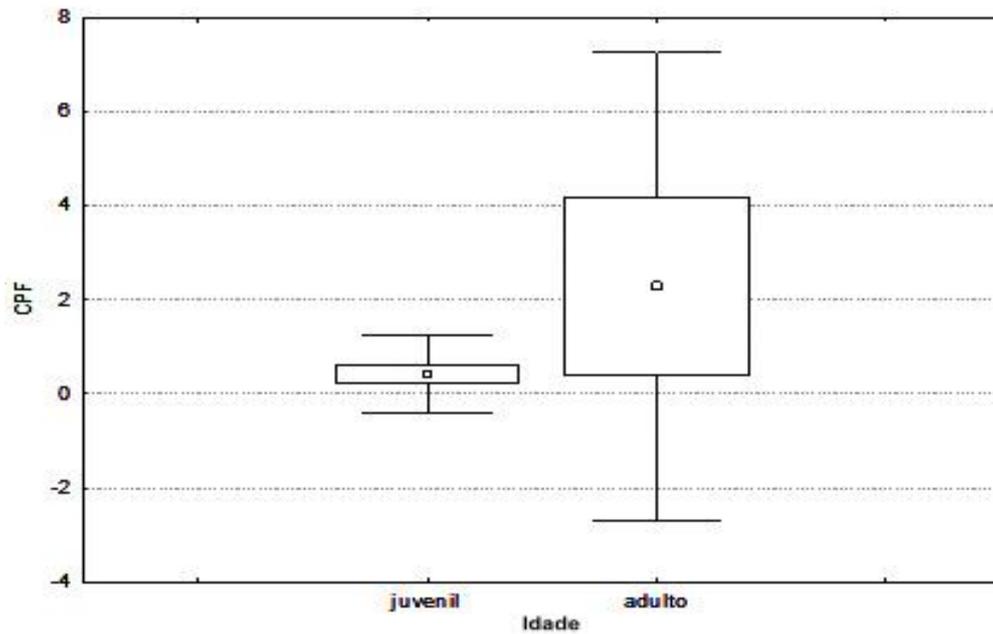


Fonte: Elaboração própria. (2013)

Para o comprimento do pênis das fêmeas imposexadas em relação às classes de tamanho, o teste estatístico verificou que não ocorreram diferenças significativas em função da sobreposição parcial dos *boxplot* (Gráfico 8).

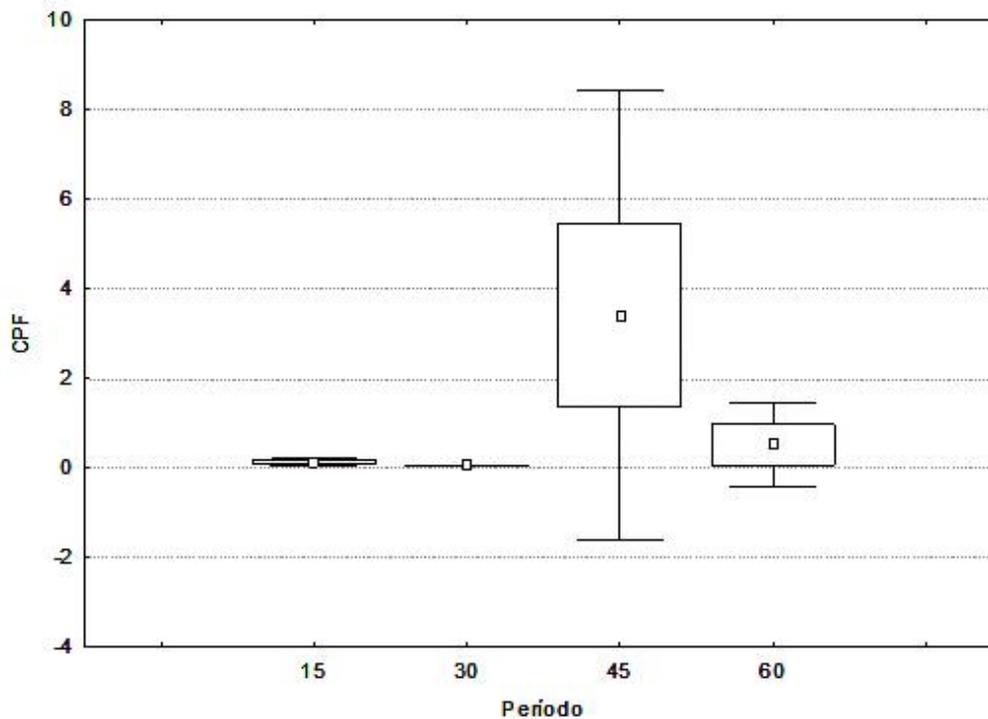
No gráfico 9 nota-se que não há sobreposição dos boxes, evidenciando o de fato a diferença significativa atribuída ao comprimento do pênis das fêmeas em relação aos períodos de análise. Quanto ao CPF, nota-se diferença expressiva do desvio padrão do 45º dia entre os demais períodos de análise. Tal diferença foi gerada pela fêmea com comprimento de pênis 14,3mm (*outlayer*) que trouxe o desvio padrão para cima. O CPF ao 30º dia apresenta-se em uma faixa estreita devido aos números muito parecidos entre as amostras, que não variaram tanto, terem feito com que o desvio padrão não aumentasse muito.

Gráfico 8 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) para comprimento do pênis (mm) da fêmea imposexada de *Leucozonia nassa* em relação ao estágio de maturação



Fonte: Elaboração própria. (2013)

Gráfico 9 - Valores médios (\pm Desvio Padrão) para comprimento do pênis (mm) das fêmeas imposexadas de *Leucozonia nassa* ao longo dos períodos de análise.



Fonte: Elaboração própria. (2013)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de populações saudáveis em áreas distantes de fontes pontuais de contaminação demonstram a relação entre o desenvolvimento do imposex e uso de anti-*foulings* à base de TBT. A continuidade no monitoramento poderá inferir sobre a utilização de tintas à base de TBT e suas possíveis influências sobre regiões controle.

O presente trabalho fez uso de dados de monitoramentos passados para as áreas amostrais para fins de diagnóstico ambiental da situação atual de contaminação por COE's. A Praia de Jacaraípe, Santa Cruz e Coqueiral são referencias quanto à ausência de contaminação por organoestânicos.

A região de Aracruz, onde se coletou o maior número de exemplares para execução deste trabalho, possui um litoral relativamente pouco urbanizado até o momento, entretanto, existe um projeto de instalação de um estaleiro de construção e reparação naval para essa localidade, e tal serviço prevê fortalecimento do polo industrial do município, e aumento na população. Com a chegada desse empreendimento, destaca-se a necessidade de aplicação de planos de gerenciamento costeiro e monitoramento ambiental, para que a ocupação se dê de forma ordenada e a qualidade ambiental do município não seja afetada negativamente.

Para uma perfeita integração do homem com o meio, é indispensável que o desenvolvimento da relação se dê de maneira sustentável, e em concordância dos interesses da população com a manutenção dos espaços, bem como, salientar a importância de se obter conhecimento dos processos naturais ao longo das áreas litorâneas e os possíveis efeitos das atividades antrópicas sobre a comunidade marinha que as habita.

Quanto à contaminação laboratorial por TBT, o presente estudo confirmou o desenvolvimento de imposex em juvenis e adultos de *Leucozonia nassa* após 2 meses de exposição ao contaminante, mostrando sensibilidade da espécie para esse organoestânico. Em se tratando de maior sensibilidade, os organismos juvenis foram mais afetados que os adultos pelo efeito da síndrome, confirmando a hipótese alternativa, de não haver diferenças significativamente importantes em relação ao tempo de exposição ao contaminante. Para se verificar maiores valores resultantes

de interferências morfológicas maiores, recomenda-se um tempo maior de duração do experimento, assim como Abidli e outros o fez em seu trabalho em 2012.

6 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A.; ABEL, P.D.; ARNOLD, D.W.; MILNE, A. Cost-benefit analysis of the use of TBT: the case for a treatment approach. **The Science of the Total Environment**. v. 258, p. 5-19, 2000.
- ABIDLI, S.; SANTOS, M.M.; LAHBIB, Y.; CASTRO, L.F.C.; REIS-HENRIQUES, M.A.; MENIF, N.T.E. Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): Imposex induction and sex hormone levels insights. **Ecological Indicators**. v. 13. p.13-21, 2012.
- ALBINO, J; PAIVA, D.S. Geomorfologia, Tipologia, Vulnerabilidade Erosiva e Ocupação Urbana das Praias do Litoral do Espírito Santo, Brasil. **Geografares**. n. 2, 2001.
- ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **The Science of the Total Environment**. v. 258. p. 99-102, 2000.
- ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**. v.40. p.23-36,1998.
- ALZIEU, C., SANJUAN, J., DELTRIEL, J.P.; BOREL, M. 'Tin contamination in Arcachon bay: Effects on oyster shell anomalies, **Marine Pollution Bulletin**. v 17. p.494-498, 1986.
- ANTIZAR-LADISLAO, B., Environmental levels toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment Internacional**. v.34. p. 292-308, 2008.
- ARAÚJO, M.L. R.; ROCHA-BARREIRA, C. A. Distribuição espacial de *Anomalocardia brasiliensis* (GMELIN, 1791) (MOLLUSCA, BIVALVIA, VENERIDAE) na Praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. **Boletim Técnico - Científico do CPENE**, Recife. v.12. n.1, p.11-21, 2005.
- AUSTEN, M.C. AND MC EVOY, A.J. Experimental Effects of Tributyltin (TBT) Contaminated Sediment on a Range of Meiobenthic Communities. **Environmental Pollution**. v.96, n.3, p.435-444, 1997.
- AXIAK V.; VELLA A.J.; MICALLEF D.; CHIRCOP P.; MINTOFF B. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. **Marine Biology**. v. 121, n.685 - 691, 1995.
- AXIAK, U, A.J. VELLA, D. AGIUS, P. BONNICI, G. CASSAR, R. CASSONE P. CHIRCOPA, D. MICALLEF, B. MINTOFF, M. SAMMUT. Evaluation of environmental levels and biological impact of TBT in Malta central Mediterranean. **The Science of the Total Environment**. v. 258. p. 89-97, 2000
- AZENHA, M.; VASCONCELOS, M.T.; Butyltin compounds in Portuguese wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50. p. 2713-2716, 2002.
- BAALS, P.W. Tributyltin (TBT) in the waters of a Scottish Sea Loch Arising from the use of antifoulant treated netting by salmon farms. **Aquaculture**. v. 65, 1987.
- BACCI, E.; GAGGI, C. Organotin Compounds in Harbour and Marina Waters From the Northern Tyrrhenian **Sea Marine Pollution Bulletin**. v. 20, n. 6, p. 290-292,1989.

BAILEY, S.K.; DAVIES, I.M. Tributyltin contamination around an oil terminal in Sullon Voe (Shetland). **Environmental Pollution**. v. 55, p.161-172, 1988

BAILEY, S.K.; DAVIES, I.M. Tributyltin contamination in the Firth of forth (1975-87). **The Science of Total Environment**. v. 76, p.185-192, 1988a.

BAINY A.C.D.; MARQUES M.R.F. Expressão do complexo citocromo P-450 1^a e das metalotioneínas na avaliação da contaminação aquática. In: MORAES, R.B.C.; CRAPEZ M.A.C.; PFEIFFER W.C.; FARINA M.; TEIXEIRA V.L.; BAINY A.C.A. Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos. 1^aed. São Paulo: Arte Ciência.

BANNINK, A.D. How Dutch drinking water production is affected by the use of herbicides on pavements. **Water Science Technology**. v. 49. p. 173-181, 2004

BAPTISTA, D.F. O uso de macroinvertebrados em procedimentos de biomonitoramento em ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12. n. 3. p.425-441, 2008.

BARROSO, C.M; MOREIRA, M.H. Reproductive cycle of *Narrarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implication for imposex studies. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 78. p. 1233-1246, 1998.

BARROSO, C.M.; MOREIRA, M.H.; GIBBS, P.E.; Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). **Marine Ecology Progress Series**, v. 201, p. 221–232, 2000.

BARTLETT, A.J; BORGMANN, U; DIXON, D.G; BATCHELOR, S.P; MAGUIRE, R.J. Accumulation of tributyltin in *Hyalella azteca* as an indicator of chronic toxicity: Survival, growth, and reproduction. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 23, n. 12. p. 2878–2888, 2004

BASHEER, C.; TAN, K.S.; LEE, H.K. Organotin and Irgarol-1050 contamination in Singapore coastal waters. **Marine Pollutin Bulletin**. v.44,n. 697-703, 2002.

BAUER, B.; FIORONI, P.; IDE, I.; LIEBE, S.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; WATERMANN, B. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: a possible indicator for tributyltin pollution. **Hydrobiologia**. v. 309, p. 15-27, 1995.

BAUER, B.; FIORONI, P.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; KALBFUS, W. The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring- results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. **Environmental Pollution**. v. 96, n. 3, p. 299-309, 1997.

BECH, M.; STRAND, J.; JACONSEN, J.A. Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. **Environmental Pollution**. v. 119, n. 253-260, 2002.

BENNETT R.F. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: MORA S.J. Tributyltin: case study of an environmental contaminant. **Cambridge Environmental Chemistry Series**. n. 8, p. 21-61, 1996.

BETTIN, C.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. **Helgol. Meeresunters.** v. 50. p. 299-317, 1996.

BLABER J.M. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. **Proceedings of Malacological Society of London**. v. 39. p. 231-233, 1970.

BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Ecologia Populacional de *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) (BIVALVIA, VENERIDAE) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo. v.34. n. 2. p. 259-270, 2008.

BORGES, C.L.L. **Avaliação temporal da poluição por anti-incrustantes organoestênicos no litoral do estado do Rio de Janeiro: antes e após o banimento nacional e internacional**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BRASIL, MARINHA. Diretoria de Portos e Costas. **Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas anti-incrustantes danosos em embarcações**. Brasil, 2007.

BRYAN, G.M.; GIBBS, P.E.; HUMERSTONE, L.G. The Decline of the Gastropod *Nucella lapillus* around South West England: Evidence for Tributyltin from Antifouling Paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 66, p.611-640, 1986.

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

BRYAN, G.W.; GIBBS, P.E. Impact of low concentration of tributyltin TBT on marine organisms: a review. In: M.C., Newmann, A.W., McIntosh, editors. **Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications**. Lewis, Ann arbour.. p. 323-361, 1991

BURT, J.S. AND EBELL, G.F. Organic Pollutants in Mussels and Sediments of the Coastal Waters off Perth, Western Australia. **Marine Pollution Bulletin**. v.30, n.11, p.723-732. 1995.

CARBALLO, M.; AGUAYO, S.; ESPERÓN, F.; FERNÁNDEZ, A.; DE LA TORRE, A.; DE LA PEÑA, E.; NUÑO, M.J. Exposición de cetáceos a contaminantes ambientales conactividad hormonal em El Atlántico. Ecosistemas. **Red. de Revistas Científicas de América Latina, Caribe, Espanha e Portugal**. v. 13, n. 3, Espanha, 2004.

CARFI, M.; CROERA, C.; FERRARIO, D.; CAMPI, V.; BOWE, G.; PIETERS, R.; GRIBALDO, L. TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. **Toxicology**. v. 249. p.11–18, 2008.

CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORREL, D.L.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. Nonpoint pollution of surface Waters with phosphorus and nitrogen **Ecological Applications**. v. 8, p. 559-568, 1998.

CARVALHO, P.N.; RODRIGUES, P.N.R.; BASTO, M.C.P.; VASCONCELOS, M.T.S.D. Butyltinlevels in severa Portuguese coastal áreas. **Environmental Monitoring Assessment**. v. 159, p. 183-190, 2009.

CASTRO I.B. **Estudo do imposex em muricídeos do gênero *Stramonita* (Mollusca: Gastropoda) no Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais), Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

CASTRO, I.B.; MATTEWS-CASCON, H.; FERNANDEZ, M.A.S. Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda): Uma indicação da contaminação por organoestânicos na costa do município de Fortaleza. **Arquivos de Ciências do Mar**. v. 33, n. 51-56, 2000.

CASTRO, I.B.; RODRIGUES-QUEIROZ, L.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha – uma revisão. **Arquivos de Ciência do Mar**. v. 40, p. 96-11, 2007.

CASTRO, I.B; PERINA, F.C; FILLMANN, G. Organotin contamination in South American coastal áreas. **Environmental Monitoring Assessment**. v.184. p.1781–1799, 2012.

CASTRO, I.B; WESTPHAL, E; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1021-1031, 2011.

CASTRO, L. F. C.; LIMA, D.; MACHADO, A.; MELO, C.; HIROMORI, Y.; NISHIKAWA, J.; NAKANISHI, T.; REIS-HENRIQUES, M. A.; SANTOS, M. M. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. **Aquatic Toxicology**. v.85, p.57-66, 2007.

CHAMP, M.A. A Review of Organotin Regulatory Strategies, Pending Actions, Related Costs and Benefits. **The Science of the Total Environment**. v.258, p. 21-71, 2000

CHAMP, M. A.; PUGH, W. L. Tributyltin Antifouling Paints: Introduction Overview. **Ocean's ' 87** - International organotin symposium,, p. 1296 -1308, 1987.

CHIEN, L.C.; HUNG, T.C.; CHOANG, K.Y.; YEH, C.Y.; MENG, P.J.; SHIEH, M.J.; HAN, B.C. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. **Science of the Total Environment**. v. 285. p.177-85, 2002.

CHOI, M.; YONG-ROCK A.; KYUM, J.P. IN-SEOK, L.; DONG-WOON, H.A., JINYU, K.; HYO-BANG, M. Accumulation of butyltin compounds in finless porpoises (*Neophocaenaasiae orientalis*) from Korean coast: Tracking the effectiveness of TBT regulation over time. **Marine Pollution Bulletin**. v. 66, 2013.

CHU, K.Y. Effects of environmental factors on the molluscicidal activities of slow-release hexabutyldistannoxane and copper sulfate. **Bulletin World Health Organ**.v. 54, 1976.

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

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 357/2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 20 de maio de 2013.

COOKE, G.M . Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. **Toxicology Letters**. v.126. p.12-130, 2002.

COSTA, M.B. **Avaliação da contaminação por compostos organoestânicos (COEs) no litoral do Espírito Santo por meio de indicadores biológicos, imposex e intersex: uma análise espacial e temporal**. Tese (Doutorado em Oceanografia Ambiental) – Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental

do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

COUTO, D.R.; PIMENTA, A.D. Comparative morphology of *Leucozonia* from Brazil (Neogastropoda: Buccinoidea: Fascioliidae). *Amer. Malac. Bull.* v. 30. n. 1. p.103-116, 2012.

CRESSWELL, T. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal Waters. *Marine Pollution Bulletin.* v. 52. p.1169-1175, 2006.

DAFFORN, K.A.; LEWIS, J.A.; JOHNSTON, E.L. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin.* v. 62. p.453-465, 2011.

DAHLLOF, I.; AGRENIUS, S.; BLANCK, H.; HALL, P.; MAGNUSSON, K.; MOLANDER, S. The effect of TBT on the structure of a marine sediment community – a boxcosm study. *Marine pollution bulletin.* v. 42. n. 8, 2001.

DAVIES I.M.; MCKIE J.C. Accumulation of total tin and tributyltin in muscle tissue of farmed Atlantic Salmon. *Marine Pollution Bulletin.* v. 18, n.7, p. 405-407, 1987.

DE MORA, S.J.; STEWART, C.; PHILLIPS, D. Sources and rate of degradation of tri(n-butyl) tin in marine sediments near Auckland, New Zealand. *Marine Pollution Bulletin,* v. 30, p. 50–57, 1995.

DELA CRUZ, M.A.T. **Condensed ecological risk assessment of ti(n-butyl)tin in the marine environment: a focus on selected areas along the west coast of Sweden.** Dissertação de Mestrado. Department of Technical Environmental Planning. Chalmers University Technology, Gothenburg, Suécia. 61p. 1998.

DEPA. Fact Sheet No. 24: Antifouling Bottom Paint. Danish Environmental Protection Agency. Ministry of the Environment, Kobenhavn, Denmark.

DONARD O.F.X.; LAMOTT M.; DELIN C.; EWALD M. High-sensitivity fluorescence spectroscopy of Mediterranean waters using a conventional or a pulsed laser excitation source. *Marine Chemistry.* v. 27. p. 117-136, 1989.

DOWSON, P.H.; BUBB, J.M.; LESTER, J. N. Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science,* v. 42, p. 551–62, 1996.

DOWSON, P.H.; BUBB, J.M.; LESTER, J.N. The effectiveness of the retail ban on TBT based antifouling paints in reducing butyltin concentrations in East Anglia, UK. *Chemosphere.* v. 28. n. 5, 1994.

DUBEY, S.K.; ROY, U. Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Applied Organometallic Chemistry,* v. 17, p. 3–8, 2003.

ELLIS, D.V. E PATTISINA, L.A. Widespread Neogastropod Imposex: A Biological Indicator of Global TBT Contamination. *Marine Pollution Bulletin.* v. 21, n. 5, p. 248-253, 1990.

EVANS S.M.; DAWSON M.; DAY J.; FRID C.L.J.; GILL M.C.; PATISSINA L. Domestic waste and TBT pollution in coastal areas of Ambom Island. *Marine Pollution Bulletin.* v. 30, n.2, p. 109 - 115, 1995.

EVANS, S.M. NICHOLSON, G.J. BROWING, C. HARDMAN, E.; SELIGMAN, O. SMITH, R. An assessment of tributyltin contamination in the North Atlantic using

imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* as a biological indicator of TBT pollution. **Invertebrate Reproduction and Development**. v.34. p. 227-287, 1998

FAFANDEL, M.; MULLER, W.E.G.; BATEL, R. Molecular response to TBT stress in marine sponge *Suberites domuncula*: proteolytical cleavage and phosphorylation of KRS_SD protein kinase. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 297. p.239-252, 2003.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 26, p.1-117, 1996.

FÉRAL, C.; LEGALL, S. The influence of the pollutant factor (TBT) on the neurosecretory mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. In: Lever, J.; Boer, H. H. (Eds.), *Molluscan Neuro-Endocrinology*. **North Holland Publishing**, Amsterdam, p. 173-175, 1983.

FERNANDEZ, M.A. Brazilian experience on TBT pollution: lessons for future studies. Marine Ecotoxicology Program, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Coastal Research**, 2004.

FERNANDEZ, M.A. New Approaches for Monitoring the Marine Environment: The Question of antifouling paints. **International Journal of Environmental Health**. v. 1. p.427-448, 2007.

FERNANDEZ, M.A.; GEBARA, L.; TELLES, G.; BISPO, L.; WAGENER, A.R. Imposex in Thais (*Stramonita*) *haemastoma* na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro: Possível impacto do uso de tiibutilestanho como anti-incrustante. 1998.

FERNANDEZ, M.A.; LIMAVERDE, M.A.; CASTRO, I. B.; ALMEIDA, A.C.M.; WAGENER, A.L.R. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil . **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p. 463-476, 2002.

FERNANDEZ, M.A.; WAGENER, A.L.R.; LIMAVERDE, A.M.; SCOFIELD, A.L., PINHEIRO, F.M., RODRIGUES, E..Imposex and surface sediment specialion: A combined approach to avaluete organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**. v. 59, p. 435-452, 2005.

FERNANDEZ, M.A.S. Compostos orgânicos de estanho na Baía da Guanabara (Rio de Janeiro): Sua distribuição no ambiente e possíveis impactos. Tese de Doutorado. 2001

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R; HERNANDO, M.D.; L. PIEDRA, L.; CHISTI, Y. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. **Analytica Chimica Acta**. v. 456 p. 303–312, 2002.

FLORY, J.; ALBER, M. Marinas: Best Management Practices and Water Quality: Prepared for GA DNR. Coastal Resources Division. **Georgia Coastal Research Council**. 2005.

FOALE, S. An Evaluation of the Potential of Gastropod Imposex as a Bioindicator of Tributyltin Pollution in Port Phillip Bay, Victoria. **Marine Pollution Bulletin**. v. 26. n. 10. p.546-552, 1993.

FOLSVIK, N.; BERGE, J.A.; BREVIK, E.M.; WALDAY, M. Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from norway. **Chemosphere**. v. 38. n.3. p.681-691, 1998.

FORSTNER, U.; SALOMONS, W. **Metals in the Hydrocycle**. Berlin: Springer-Verlag. 349 p., 1984.

FORSYTH, D.S.; JAY, B. Organotin leachates in drinking water from chlorinated poly (vinyl chloride) (CPVC) pipe. **Applied Organometallic Chemistry**. v. 11. p. 551-558, 1997.

GADD, G.M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation and environmental fate. **The Science of the Total Environment**, v. 258, p. 119-127, 2000.

GIANGUZZA, M.; DOLCEMASCOLO, G.; MANSUETO, C. E PELLERITO, L. Effects of Tributyltin Chloride Exposure on Larvae of *Ciona intestinalis* (Urochordata): An Ultrastructural Study. **Appl. Organomet. Chem.**, v. 10, p. 405-413, 1996.

GIBBS P.E.; BRYAN G.W.; PASCOE P.L.; BURT G.R. Reproductive abnormalities in female *Ocenebra erinacea* (Gastropoda) resulting from tributyltin-induced imposex. **J Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 70, p. 639-656, 1990.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W.; PASCOE, L. TBT-Induced Imposex in the Dogwhelk, *Nucella lapillus*: Geographical Uniformity of the Response and Effects. **Marine Environmental Research**. v. 32. p. 79-87, 1991.

GIBBS, P.E.; BEBIANO, M.J; COELHO, M.R. Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution with notes on a species (*Collumbella rustica*) lacking the imposex response. **Environmental Technology**. v.1, n. 1219-1224, 1997.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.M. Reproductive failure in populations of the dog-whelk *Nucella lapillus*, ceased by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. **Journal of the Marine Biological Association**, v. 66, p. 767 – 777, 1986.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In: *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*. DE MORA, S. J. Cambridge University Press, Cambridge, p. 212-236, 1996.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod mollusks. In: *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*, KRAMER, K.J.M. Ed. CRC Press, Inc., Boca Raton. p. 205-226. 1994.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). **Journal Marine Biology Association United Kingdom**. v. 68. p. 1482-1487, 1987

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P.L.C.; BURT, GR. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of Tributyltin (TBT) contamination. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 67, p. 505-507, 1987

GOLDBERG, E.D. TBT: an environmental dilemma. **Environm: Science and Policy for Sustainable Development** v.28, p. 17-44, 1986.

GRAVEL, P., JOHANNING, K., MCLACHLAN, J., VARGAS, J. A.; OBERDÖRSTER, E. Imposex in the intertidal snail *Thais brevidentata* (Gastropoda: Muricidae) from the Pacific coast of Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**. v. 54. n. 1. p.21-26, 2006.

- GROTE, K.; STHALSCHMIDT, B.; TALSNESS C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K.E., CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**. v.202. p.145-158, 2004.
- GUÉRIN, T.; SIROT, V.; VOLATIER, J.-L.; LEBLANC, J.-C. Organotin levels in seafood and its implications for health risk in high-seafood consumers. **Science of the Total Environment**. v. 388. p. 66-77, 2007.
- GURUGE, K.S; H. IWATA, H. TANAKA; S. TANABE. Butyltin Accumulation in the Liver and Kidney of Seabirds . **Marine Environmental Research**. v. 44, N. 2, pp. 191-199, 1997
- HARA, R.V.; LOPES, B.P.V.; SANTOS, F.P, DOS.; OLIVEIRA, R.J. Aplicabilidade De Ensaio Da Genética Toxicológica No Biomonitoramento De Ambientes Aquáticos e Promoção Da Saúde Humana. **Terra e Cultura**. n. 48. ano 25, 2009.
- HARINO, H.; IWASAKI, N., ARAI, T.; OHJI, M.; MIYAZAKI, N. Occurrence of antifouling biocides and fluorinated alkyl compounds in sediment core from deep sea: Sugura Bay, Tosa Bay, and Nankai Trough, Japan. **Arch. Environmental Contamination Toxicology**. v. 57, p. 661-669, 2009
- HEIDRICH, D.D.; STECKELBROECK, S.; KLINGMULLER, D. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. **Steroids**. v. 66. p.763-769, 2001.
- HOCH, M. Organotin Compounds in The Environment – an Overview. **Applied geochemistry** v. 16. p. 719-743, 2001.
- HORIGUCHI, T.; KOJIMA, M.; HAMADA, F.; KAJIKAWA, A.; SHIRAISHI, H.; MORITA, M.; SHIMIZU, M. Impact of Tributyltin and Triphenyltin on Ivory Shell (*Babylonia japonica*) Populations. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, 2006.
- HORIGUCHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M.; YAMAZAKI, S.; MORITA, M. Imposed sex in Japanese Gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda): Effects of Tributyltin and Triphenyltin from Antifouling Paints. **Marine Pollution Bulletin**. v. 31, n.4-12, p.402-405, 1995.
- HORIGUCHI, T.; IMAI, T.; CHO, H.S.; SHIRAISHI, H. SHIBATA, Y.; MORITA, M. E SHIMIZU, M. Acute Toxicity of Organotin Compounds to the Larvae of the Rock Shell, *Thais clavigera*, the Disk Abalone, *Haliotis discus*, and the Giant Abalone, *Haliotis madaka*. **Marine Environmental Research**. v. 46, n. 1-5, p. 469-473, 1998.
- HORIGUCHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M.; MORITA, M. Imposed sex and organotin compounds in *Thais clavigera* e *T. bronni* in Japan. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 74. p. 651-669, 1994.
- HUGGETT, R.J.; UNGER, M.A.; SELIGMAN, P.F.; VALKIRS, A.O. The marine biocide tributyltin: assessing and managing the environmental risks. **Environmental Science and Technology**. v. 26, p. 232-237, 1992.
- JENSEN, H.F.; HOLMER, M.; DAHLÖF, I. Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, 2004
- KAN-ATIREKLAP, S. ; TANABE, S. ; SANGUANSIN, J; TABUCANON, M.S.; HUNGSPREUGS, M. Contamination by Butyltin Compounds and Organochlorine Residues in Green Mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand Coastal Waters. **Environmental Pollution**. v. 97, n. 1-2, p. 79-89, 1997b. Green Mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand Coastal Waters. *Env. Pol.*, v. 97, n. 1-2, p. 79-89, 1997.

- KARLSSON, J.; EKLUND, B. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49. p.546, 2004.
- KASS, G. E. N.; ORRENIUS, S. Calcium signaling and cytotoxicity. **Environmental Health Perspectives**. v.107. n.1, p. 25–35, 1999.
- KIM B.G.; TANABE S.; IWAKIRI R.; TATSUAKAWA R.; AMANO W.; MIYAZAKI N. Accumulation of Butyltin Compounds in Risso's Dolphin (*Grampus griseus*) from the Pacific Coast of Japan: Comparison with Organochlorine Residue Pattern. **Environmental Science Technology**. v. 30. p. 2620-2625, 1996.
- KO, M.M.C.; BRADLEY, G.C.; NELLER, A.H.; BROOM, M.J. Tributyltin Contamination of Marine Sediments of Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4-12, p. 249-253, 1995.
- KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**.90, S77–S85, 2009.
- LANGSTON, W. J E POPE, N.D. Determinants of TBT Adsorption And Desorption in Estuarine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 32-43, 1995.
- LEMGHICH, I.; BENAJIBA, M. H. Survey of imposex in prosobranchs mollusks along the northern Mediterranean coast of Morocco.. **Ecological Indicators**. v.7. p. 209-214, 2007.
- LEUNG, K. M. Y.; KWONG, R. P. Y.; Ng, W. C.; Horiguchi, T.; Qiu, J. W.; Yang, R.; Song, M.; Jiang, G.; Zheng, G. J.; Lam, P. K. S. Ecological risk assessments of endocrine disrupting organotin compounds using marine neogastropods in Hong Kong. **Chemosphere**. v. 65.p. 922-938, 2006.
- LEWIS, J.A. Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. **Mater. Forum**. v.22. p.41-61, 1998
- LIMA A.F.A. **Estudo dos efeitos da contaminação por organoestênicos em fêmeas de *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Prosobranchia: Muricidae)**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- LIMA, A.F.A.; CASTRO, I.B.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Inposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 24. n.1. p. 85-90, 2006.
- LO, S.; ALLÉRA, A.; ALBERS, P.; HEIMBRECHT, J.; JANTZEN, E.; KLINGMULLER, D.; STECKELBROECK, S.; Diethioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **Journal of Steroid Biochemistry**. v. 84. p.569-76, 2003.
- LUAN, T.G.; JIN, J.; CHAN, S.M.N.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1560–1565, 2006.
- LUDGATE J. Economic and Technological Impact of TBT Legislation on the USA Marine Industry. Proceedings, **The Oceans** - An International Workplace Conference. v. 4. p.1309 -1313, 1987.
- MAGALHÃES, C.A.; STRUCHI, P.P.; ASBAHR, M. Evidências de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Prosobranchia) em áreas portuárias do estado de São Paulo. **Proceedings, COLACMAR**. v. 282, 1997.

- MAGALHÃES, D. P.; FERRA-O FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MAGUIRE, R.J., CAREY, J.H., & HALE, E.J. Degradation of the tri-n-butyltin species in water. **J. agric. food Chem.** v.3. p. 1060-1065, 1983.
- MARSUNARI, S.; FORNERIS, L. O Ecossistema fital – Uma revisão. In: **Seminários de Biologia Marinha**. Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. p.149-169, 1981.
- MATTHEWS-CASCON, H.; MATTHEWS, H. R.; KOTZIAN, C. B. Os gêneros *Fasciolaria* (Lamarck, 1799) e *Leucozonia* (Gray, 1847) no nordeste brasileiro (Mollusca: Gastropoda: Fasciariidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1989.
- MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.17. n.1, p.37-43, 1998.
- MENSINK, B. P.; KRALT, H.; VETHAAK, A. D.; HALLERS-TJABBES, C. C. T.; KOEMAN, J. H.; HATTUM, B. V.; BOON, J. P. Imposex induction in laboratory reared juvenile *Buccinum undatum* by tributyltin (TBT). **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 11, p. 49–65, 2002.
- MENSINK, B.P., BOON, J.P., TEN HALLERS-TJABBES, C.C., VAN HATTUM, B., KOEMAN, J.H., Bioaccumulation of organotin compounds and imposex occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, The Netherlands). **Environmental Technology**. v.18. p.1235-1244, 1997.
- MICHEL, P.; AVERTY, B. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update, **Marine Pollution Bulletin**. v.38, n. 4, p. 268–275, 1999.
- MINCHIN, D.; BAUER, B.; OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; DUGGAN, C.B. Biological indicators used to map organotin contaminations from a Fishing Port, Killybegs, Ireland. **Marine Pollution Bulletin**. v. 34. n. 4. p. 235–243, 1997.
- MINCHIN, D.; STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; BAUER, B.; DUGGAN, C.B.; KEATINGE, M. Biological Indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. **Marine Pollution Bulletin**. v. 32, n. 2, p. 188-195, 1996.
- MORA S.J.; PHILLIPS D.R. Tributyltin (tbt) pollution in riverine sediments following a spill from a timber treatment facility in Henderson, New Zealand. **Environmental Technology**. v. 18, n.1187 - 1193, 1997.
- MORAES, R. B. C. Estudos sobre poluição marinha: importância e perspectiva. In: MORAES, R. B. C.; CRAPEZ, M. A. C.; PFEIFFER, W. C.; MARCOS FARINA; TEIXEIRA, V. L.; BAINY, A. C. A. **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. 1º ed. São Paulo: Arte & Ciênci Villipress. v.1, p.9-11. 2001
- MORCILLO, Y.; PORTE, C. Monitoring of organotin compounds and their effects in marine molluscs. **Trends in analytical chemistry**. v. 17, n 2, 1998
- NOVELLI, A.A; ARGESE, E. TAGLIAPIETRA, D.; BETTIOL, C.; GHIRARDINI, A.V. Toxicity of Tributyltin And Triphenyltin to early life-stages of *Paracentrotus Lividus* (Echinodermata: Echinoidea). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 21. n. 4. p. 859–864, 2002.

- OEHLMANN, J.; BAUER, B.; MINCHN, D.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; FIORONI, P.; MARKET, B. Impossex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interespecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. **Hydrobiologia**. V. 378, p. 199-213, 1998
- OEHLMANN, J.; FIORONI, P.; STROBEN, E.; MARKERT, B. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. **The Science of the Total Environment**. v.188. p. 205-223, 1996
- OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; FIORONI, P. The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). **Journal of Molluscan Studies**. v. 57, p. 375-390, 1991.
- OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; FIORONI, P. The rough tingle *Ocenebra erinacea* (Neogastropoda:Muricida): an exhibitor of imposex in comparison to *Nucella lapillus*. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 46, n. 3, p. 311-328, 1992.
- OHJI, M.; TAKEUCHI, I.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; MIYAZAKI, N. Differences in the acute toxicities of tributyltin between the Caprellidea and the Gammaridea (Crustacea: Amphipoda). **Marine Pollution Bulletin**. v..44, p. 16–24, 2002.
- OKAMURA, H.; MIENO, H. In **Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides**; Konstantinou, I.K, ed: Springer-Verlag: Berlin, cap. 9, 2006.
- OLIVEIRA, R.M.S. **Estudo da composição e das possíveis fontes dos sedimentos das praias de Bicanga e Manguinhos-ES**. Monografia de Bacharelado – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES. 1995.
- OYEWO, E.O. Organotin compounds, fouling and the marine environment. **Ocean & Shoreline Management**. v. 12, n. 285-294, 1989.
- PEDRUZZI, F.C. **Análise da contaminação por Organoestânicos no litoral do Espírito Santo, sobre a razão sexual de *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791), por meio de duas metodologias: Convencional e Não-destrutiva**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.
- RAMÓN, M.; AMOR, M.J. Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. **Marine Environmental Research**. v. 52. p. 463-475, 2001.
- REID, B.A. A Chemical on Trial. Daliy Press/ The Times Herald. New Port News. V.A. Reprinted Section-ceollection of article. 1986.
- RIBEIRO V. **Avaliação do Potencial da Espécie *Stramonita haemastoma* (Kool, 1987) como indicador biológico de contaminação ambiental por compostos Organo-estânicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) - Universidade Federal Fluminense. 2002.
- RIOS, E.C. Sea shells of Brazil. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. 328 p. 1994.
- RITSEMA, R.; LAANE, R.W.P.M. Butyltins in marine waters of the Netherlands in 1988 and 1989; concentrations and effects. **Marine Environmental Research**.v.32,1991.

ROACH, A. C.; WILSON, S. P. Ecological impacts of tributyltin on estuarine communities in the Hastings River, NSW Australia. **Marine Pollution Bulletin**. v. 50, p. 1780-1786, 2009.

RONIS, M. J. J.; MASON, A. Z. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: effects of tributyltin. **Marine Environment Research**. v. 42, p.161-166, 1996.

RUIZ, J. M.; BACHELET, G.; CAUMETTE, P.; DONARD, O. F. X. Three Decades of Tributyltin in the Coastal Environment with Emphasis on Arcachon Bay, France. **Environmental Pollution**. v.93, n.2, p.195-203, 1996.

RUIZ, J.M.; QUINTELA, M.; BARREIRO, R. Ubiquitous Imposex and Organotin Bioaccumulation in Gastropods *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): A Possible Effect of Nearshore Shipping., **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 164. p. 237-244, 1998.

SAITOH, M.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; TANABE, M.; MU, Y. M.; NISHI, Y.; NOMURA, M.; OKABE, T.; GOTO, K.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Tributyltin or Triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumour cell line KGN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 289. p.198-204, 2001.

SALOMONS, W.; FORSTNER, U. **Metals in the Hydrocycle**. Berlin: Springer-Verlag, 349 p., 1984.

SANTILLO, D.; JOHNSTON, P. J; LANGSTON, W, J. Late lessons from early warnings:the precautionary principle 1896–2000, **European Environment Agency**. n. 22, 2001.

SANTOS, D. M, dos; SANT'ANNA, B. S; GODOI, A. F. L; TURRA, A; MARCH, M. R. R, de., Several studies have evaluated organotins in abiotic and biotic matrices, and the results indicate that there is still cause for concern - Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. **Nova Science Publishers**, 2011.

SANTOS, M. M.; CASTRO, L. F.; VIERA, M. N.; MICHAEL, J.; MORABITO, R.; MASSANISSO, P.; REIS-HENRIQUES, M. A. New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C. Toxicology & Pharmacology*. v.141. p.101-109, 2005.

SANTOS, M. M.; ENES, P.; REIS-HENRIQUES, M.A.; KUBALLA, J.; CASTRO, L. F. C.; VIEIRA, M. N. Organotin levels in seafood from Portuguese markets and the risk for consumers. **Chemosphere**. v. 5, p.661-666, 2009.

SAYER, C.D.; HOARE, D.J.; SIMPSON, G.L.; HENDERSON, A.C.G.; LIPROT, E.R.; JACKSON, M.J.; APPLEBY, P.G.; BOYLE, J.F.; IWAN JONES, J.; WALDOCK, M.J. TBT Causes Regime Shift in Shallow Lakes. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 5269-5275, 2006.

SCHWEINFURTH, H.A., GÜNZEL, P. The Tributyltins: Mammalian Toxicity and Risk Evaluation for Humans, in **Oceans 87**. Proceedings, Volume Four: International Organotin Symposium, Halifax, Nova Scotia, Canada, September 28-October, 1987, p. 1421-1431, 1987.

SEKIZAWA, J.; SUTER, G.; BIRNBAUM, L. Integrated human and ecological risk assessment: a case study of tributyltin and triphenyltin compounds. **Human and Ecological Risk Assessment**. v.9. n.1. p. 325–342, 2003.

- SHIM W.J.; KAHNG S.H.; HONG S.H.; KIM N.S.; SHIM J.H. Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. **Marine Environmental Research**. v. 49, n.435 - 451, 2000.
- SMITH, B. S. Tributyltin compounds induced male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Llyanassa obsoleta*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 1, n. 3, p. 141-144, 1981.
- SMOCK; SRONEBURNER; CLARK, The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products two species of algae and the fathead minnow. v.. 10, p. 537-543, 1976.
- SPOONER, N.; GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W.; GOAD, L. J. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk *Nucella lapillus*, and the development of imposex. **Marine Environment Research**. v.32. p.37-49, 1991.
- STEWART, C. JONES, S.J; MILES, M.C. Imposses in New Zeland Neogastropods. **Marine Pollution Bulletin**. v. 24, p.204-209, 1992.
- STEWART, C.; DE MORA, S.J.; JONES, M.R.L. ; MILLER, M.C. Imposex in New Zealand Neogastropods. **Marine Pollution Bulletin**. v. 24, n. 4, p. 204-209, 1992.
- STEWART, C.; THOMPSON, J.A.J. Extensive Butyltin Contamination in Southwestern Coastal British Columbia, Canada. **Marine Pollution Bulletin**. v .28, n.10, p. 601-606, 1994.
- STRAND, J.; JACOBSEN, J. A. Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. **Science of the Total Environment**. v. 350. p.72-85, 2005.
- STROBEN E.; OEHLMANN J.; FIORONI P. The Morphological Expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a Potential Indicator of Tributyltin **Pollution Marine Biology**. v. 113, n.4, p. 625 - 636, 1992.
- STROBEN, E.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; FIORONI, P.; OEHLMANN, J. A. Comparative Method for Easy Assessment of Coastal TBT Pollution by the Degree of Imposex in Prosobranch species *Haliotis*. v. 24:1-12, 1995.
- SUNDERMANN, G.; BAUER, B.; OEHLMANN, J. Ultrastructure of prostate gland tissue in males and females with intersex phenomena of *Littorina littorea* L. **Hydrobiologia**, v. 378, p. 227–233, 1998.
- SWENNEN C.; RUTTANADAKUL N.; ARDSEUNGNERN S.; SINGH H.R.; MENSINK B.P.; TEN HALLERS-TJABBES C.C. Imposex in Sublittoral and Littoral Gastropods From the Gulf of Thailand and Strait of Malacca in relation to Shipping. **Environmental Technology**. v. 18, n.1245 - 1254, 1997.
- SWENNEN, C.; SAMPANTARAK, U.; RUTTANADAKUL, N. TBT-pollution in the Gulf of Thailand: A re-inspection of imposex incidence after 10 years. **Marine Pollution Bulletin**. v. 58. p.526–532, 2009.
- TANABE, S.; PRUDENTE, M.; MIZUNO, T.; HASEGAWA, J.; IWATA, H.; MIYAZAKI, N. Butyltin Contamination in Marine Mammals from North Pacific and Asian Coastal Waters. **Environmental Science & Technology**. v.32. n. 2. p.193-198, 2011.
- TAYLOR, J.D.; MORRIS, N.J.; TAYLOR, C. Food Specialization and the evolution of predatory prosobranch gastropods. **Paleontology**. v. 23. part. 2. p.375-409, 1980.

- TEN HALLERS-TJABBES C.C.; KEMP J.F.; BOOM J.P. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. **Marine Pollution Bulletin**. v. 28, n.5, p. 311-313, 1994.
- THOMÉ, J.W.; GIL, G.; BERGONCI, P.E.A.; TARASCONI, J.C. **As conchas das nossas praias**. 2. ed. Porto Alegre: Redes Editora, 2010.
- TITLEY-O'NEAL, C.P; MUNKITTRICK, K.R; MACDONALD, B.A. The effects of organotin on female gastropods. **Journal of Environmental Monitoring**. V.13. 2011
- TOMMASI, Luis Roberto. **A degradação do meio ambiente**. 3º ed. São Paulo: Nobel, 1977.
- TURNER, A. Marine pollution from antifouling paint particles. **Marine Pollution Bulletin**. v.60. p.159-171, 2010.
- USEPA, 2004. Ambient aquatic life water quality criteria for Tributyltin (TBT) – Final. United States Environmental Protection Agency, EPA 822-R-03-031.
- VAN DEN BROECK, H.; DE WOLF, H.; BACKELJAU, T.; BLUST, R.; Comparative assessment of reproductive impairment in the gastropod mollusk *Littorina littorea* along the Belgian North Sea coast. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3063–3069, 2009.
- VANS, S.M.; BIRCHENOUGH, A.C.; BRANCATO, M.S. The TBT ban: out of the frying pan into the fire? **Marine Pollution Bulletin**. v. 40, p. 204-211, 2000.
- VASCONCELOS, P.; GASPAR, M. B.; CASTRO, M. Development of indices for nonsacrificial sexing of imposex-affected *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae). **Journal of Molluscan Studies**. v.72. p.285-294, 2006.
- VERMEIJ, G.J; SNUDER, M.A. *Leucozonia ponderosa*: A New Fasciolariid Gastropod from Brazil. In: The Nautilus. The Bailey- Matthews Shell Museum American Malacologists, Inc. **Delaware Museum of Natural History**. v.112. n.4. p.117-119, 1998.
- VISHNA KIRAN, Y.; ANIL, A.C. Record of Imposex in *Cronia konkanesis* (Gastropoda, Muricidae) from Indian Waters. **Mar. Env. Res.**, v. 48. p.123-130, 1999.
- VISHWAKIRAN, Y.; ANIL, A.C.; VENKAT, K.; SAWANT, S.S. Gyrineumnatator: a potential indicator of imposex along the Indian coast. **Chemosphere**. v. 62. p.1718-1725, 2006
- WHO: World Health Organization. Tributyltin Compounds. Geneva, 1990.
- YEBRA, D.M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling Technology – Past, Present and Future Steps Towards Efficient and Environmentally Friendly Antifouling Coatings. **Prog. Org. Coat.** v. 50. p. 75-104, 2004.
- ZOBEL, C.E; ALEN, E.C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. **J. Bacteriol. Virol.** v. 29. p.239-251, 1935.