

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

MARCELLA BUENO RIBEIRO

**OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO POR TRIBUTILESTANHO (TBT) NA BAÍA
DE VITÓRIA, ES POR MEIO DE INTERSEX EM *Littoraria angulifera*
(GASTROPODA, CAENOGASTROPODA, LITTORINIDAE)**

VITÓRIA

2013

MARCELLA BUENO RIBEIRO

**OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO POR TRIBUTILESTANHO (TBT) NA BAÍA
DE VITÓRIA, ES POR MEIO DE INTERSEX EM *Littoraria angulifera*
(GASTROPODA, CAENOGASTROPODA, LITTORINIDAE)**

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

Orientador: Prof. MSc. Marcelo Paes Gomes.

VITÓRIA

2013

MARCELLA BUENO RIBEIRO

Ocorrência de contaminação por Tibutilestanho (TBT) no manguezal da Baía de Vitória, ES por meio de intersex em *Littoraria angulifera* (Gastropoda, Caenogastropoda, Littorinidae)

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

Aprovado em _____ de 2013, por:

Prof. MSc. Marcelo Paes Gomes

Prof. Dra. Fernanda Tonini Gobbi

MSc. Bruno Ferreira da Silva

Aos meus pais e irmã, que amo tanto, por terem
sempre me apoiado nos momentos difíceis.

*Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho,
Eles passarão...
Eu passarinho!*

Mário Quintana (Prosa e Verso, 1978)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele não teria chegado a lugar nenhum.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Marcelo, e minha irmã, Mirella, o meu maior agradecimento. Pela compreensão dos momentos ausentes e ajuda nos momentos difíceis.

A Mercia Barcelos da Costa, minha orientadora, que me acolheu no laboratório de Malacologia e hoje é como uma mãe para mim.

A Gabriela Carvalho Zamprogno, que com seu jeito meigo, me fez sentir em casa, e é para mim uma irmã mais velha que nunca tive.

Aos meus amigos de faculdade, Bruno, Cecília, Fred, Otávio e Rayani, por fazerem os meus dias mais alegres e por estarem presentes em todos os momentos.

À nossa estrela, que ela nunca deixe de brilhar...

A Fernanda Tonini Gobbi, que acreditou em mim desde o início, e sem sua ajuda talvez eu não teria chegado onde cheguei.

Aos amigos de laboratório, Gabriel, Karina, Heitor, Millena, Ludmila, Marcela e Rebeca, pelo apoio no trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao Luiz E. Gomes, pela amizade, pelos conselhos e pela análise crítica.

Ao Bruno Ferreira, pela bondade e vontade em ajudar sem mesmo me conhecer.

Ao Fábio pela ajuda na montagem dos experimentos anteriores.

Aos meus amigos mais antigos, Caio, Luciano, Vitor, Aline, Rafaela, Lucas e Caleb, que estiveram comigo ao longo de todos esses anos, me animando e apoiando nos momentos em que eu estive prestes a desistir.

Ao Emmanoel Loss Dias, por ter me ajudado tanto, talvez até sem perceber, no meu crescimento pessoal, por me fazer enxergar as coisas com outros olhos e, sem ele talvez eu não tivesse descoberto minha vocação.

Aos meus parentes que moram longe, mas que sempre me apoiaram, me ajudaram e torceram por mim.

Aos professores que sempre me ajudaram. E a todos, que de qualquer maneira, contribuíram para esse trabalho.

RESUMO

Intersex é um bioindicador para TBT, usado em tintas anti-incrustantes aplicadas nos cascos de navios e outras embarcações para evitar bioincrustação, e ocorre em algumas espécies de gastrópodes. Essa síndrome é caracterizada pela transformação gradual de órgãos reprodutivos paliais em estruturas morfológicamente masculinas. Estudos visando verificar a contaminação por TBT utilizando bioindicadores em manguezal são recentes no Brasil. O objetivo desse estudo foi verificar a intensidade da contaminação por TBT no manguezal da Baía de Vitória, por meio de intersex em *Littoraria angulifera*. Esse estudo foi desenvolvido por meio de coletas em oito pontos amostrais, comparando áreas na franja (região mais próxima do rio) e na bacia (região mais interna). Cerca de 30 exemplares foram coletados em cada ponto e transportados para o laboratório. Os exemplares foram anestesiados, as conchas foram medidas, quebradas e os estágios de intersex analisados. Foram encontrados indivíduos em todos os pontos localizados na franja e apenas em quatro pontos localizados na bacia, totalizando 352 exemplares de *L. angulifera*. Do total de 165 fêmeas coletadas nos 12 pontos amostrais, 37% estavam intersexadas. A percentagem de intersex nos pontos de amostragem variou entre 0% e 84,6%. O índice de intersex (ISI) variou entre 0 e 3. Altos valores para a percentagem de intersex e ISI foram encontrados nas áreas mais próximas a marinas e estaleiros de manutenção de pequenas embarcações. O comprimento médio de concha dos exemplares variou entre 29,8 e 21,8 cm. Os resultados obtidos confirmam que a baía de Vitória está sendo contaminada por TBT.

Palavras-chave: TBT. *Littoraria angulifera*. Manguezal. Intersex. Baía de Vitória. Biomonitoramento. Bioincrustação.

ABSTRACT

Intersex is a bioindicator for TBT, used in antifouling paints applied to the hulls of ships and other vessels to prevent biofouling, and occurs in some species of gastropods. This syndrome is characterized by the gradual transformation of the reproductive organs palial structures morphologically male. Studies to investigate the contamination by TBT using biomarkers in mangrove are recent in Brazil. The aim of this study was to assess the intensity of TBT contamination in the mangrove of Victoria Harbour through intersex in *Littoraria angulifera*. This study was developed through collection in eight sampling points, comparing the fringe areas (region closest to the river) and bowl (innermost region). About 30 specimens were collected at each point and transported to the laboratory. Specimens were anesthetized, the shells were measured, broken and intersex stages analyzed. Individuals were found at all points located on the fringe and only four points located in the basin, totaling 352 copies of *L. angulifera*. Out of 165 females collected in 12 sampling points, 37 % were intersexadas. The percentage of intersex at the sampling points ranged from 0% to 84.6%. Intersex index (ISI) varied between 0 and 3. High values for the percentage of intersex and ISI were found in areas closer to the marinas and shipyards maintenance of small boats. The average length of the shell specimens ranged between 29.8 and 21.8 cm. The results confirm that the Vitória Bay is being contaminated by TBT.

Keywords: TBT. *Littoraria angulifera*. Mangrove. Intersex. Vitória Bay. Biomonitoring. Biofouling.

LISTA DE SIGLAS

TBT – Tributilestanho

DBD – Dibutilestanho

MBT – Monobutilestanho

TPT – Trifenilestanho

DPT – Difenilestanho

MPT – Monofenilestanho

COE's – Compostos Orgânicos de Estanho

OT's - Organoetânicos

ISI – Índice de Sequência de Intersex

VD – Vaso deferente

VDSI – Índice de Sequência de Vaso Deferente

RPLI – Índice de Relação do Comprimento de Pênis

RPSI – Índice de Relação de Tamanho do Pênis

I% - Percentagem de Intersex

IMO – Organização Marinha Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 AMBIENTE DE ESTUDO	23
2.2 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS (COE's)	26
2.3 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS E SEUS RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA	29
2.4 IMPOSEX.....	32
2.5 INTERSEX	33
2.6 LITTORINIDAE	34
2.6.1 Mollusca	35
2.6.2 Gastropoda	35
2.6.3 Prosobranchia	36
2.6.4 Caenogastropoda	36
2.6.5 Mesogastropoda	37
2.6.6 Littorinidae	37
2.7 CONTAMINAÇÃO POR COE's EM <i>Littoraria</i> spp.	41
2.8 ESTRATÉGIAS DE BIOMONITORAMENTO	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 DEFINIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	47
3.2 METODOLOGIA	48
3.3 ANÁLISE DE INTERSEX	50
3.4 ANÁLISE DE DADOS	50
3.5 ESCOLHA DA ESPÉCIE.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 DISTRIBUIÇÃO DA RAZÃO SEXUAL NAS ÁREAS AMOSTRAIS.....	57
4.2 ÍNDICES DE INTERSEX.....	58
4.3 COMPRIMENTO DAS CONCHAS	61
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas marinhos são receptores temporários ou finais da poluição por poluentes químicos que, por sua vez, são decorrentes de ações antrópicas diretas ou indiretas (MORAES et al., 2001).

O problema da proliferação de animais e plantas em navios e estruturas imersas em água do mar têm sido reconhecido (BALLS, 1987). A necessidade de anti-incrustantes eficazes em estruturas submersas é de extrema importância para a indústria naval, pois reduz a rugosidade dos cascos de embarcações e, conseqüentemente, reduz o consumo de combustíveis fósseis, além de reduzir também os riscos da exportação e importação de espécies indesejáveis (ABBOTT et al., 2000; EVANS; BIRCHENOUGH; BRANCATO, 2000; CASTRO; RODRIGUES-QUEIROZ; ROCHA-BARREIRA, 2007; MARINHA DO BRASIL, 2007; KOTRIKLA, 2009).

A redução do gasto com o combustível salvo pelo uso de anti-incrustantes, evita o lançamento de aproximadamente 23 milhões de toneladas de dióxido de carbono na atmosfera por ano (ABBOTT et al., 2000). As primeiras tintas anti-incrustantes eram a base de cobre (BALLS, 1987). Em meados de 1960, foram desenvolvidas tintas com base nos compostos biocidas a base de estanho, contendo em sua fórmula, particularmente, o Tributilestanho (TBT) (BAILEY; DAVIES, 1988).

Compostos organoestânicos (COE's) são contaminantes onipresentes em ecossistemas marinhos e de água doce, devido a sua vasta utilização em produtos industriais e de consumo, incluindo biocidas em tintas anti-incrustantes em navios, barcos e instalações *off-shore*, pesticidas agrícolas, conservantes de materiais, catalisadores em vários materiais (por exemplo: poliuretano), PVC e outros plásticos, e tem sido usados desde o início dos anos 1970 (RISTEMA; LAANE, 1991; BAUER et al., 1997; MORCILLO; PORTE, 1998; DAHLLOF et al., 2001; FERNANDEZ, 2004; ANTIZAR-LADISLAO, 2008; CHOI et al., 2013).

O estudo dos efeitos da contaminação por TBT tornou-se de grande interesse quando tintas anti-incrustantes foram relacionadas ao declínio de moluscos marinhos em áreas costeiras, bem como outros efeitos prejudiciais em organismos não-alvo, tanto na meiofauna quanto na macrofauna, e sua deposição nos sedimentos aquáticos (DOWSON; BUBB; LESTER, 1994; KO et al., 1995; DAHLLOF

et al., 2001; ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Além disso, o TBT também é prejudicial às algas, crustáceos, esponjas, equinodermos, peixes, répteis, mamíferos, aves marinhas e até para seres humanos, ao ingerirem alimentos contaminados. (AXIAK et al., 2000; FAFANDEL; MULLER; BATTEL, 2003; JENSEN; HOLMER; DAHLLOF, 2004; CASTRO; RODRIGUES-QUEIROZ; ROCHA-BARREIRA, 2007; FERNANDEZ et al., 2006)

Os feitos desses contaminantes em manguezais ainda não são bem conhecidos. Os manguezais estão sob frequente ameaça de acumulação de poluentes, os quais podem ser importados para esse ecossistema por meio dos rios e correntes (KRUITWAGEM et al., 2008). A distribuição, o comportamento e o acúmulo desses poluentes químicos são definidos pela hidrologia dos manguezais, pela classe dos poluentes, pelas propriedades dos sedimentos (KRUITWAGEN et al., 2008), inclusive pelas variações na granulometria dos sedimentos (ZULOAGA et al., 2009).

Os moluscos são um dos grupos faunísticos considerados como dominantes nas comunidades que compõem o ecossistema manguezal e exercem um papel ecológico significativo na estrutura e no funcionamento do mesmo (ASHTON; MACINTOSH; HOGARTH, 2003; PRINTRAKOON; WEELS; CHITRAMVONG, 2008; CANNICCI et al., 2008).

Os gastrópodes são extremamente sensíveis à contaminação por TBT (BAILEY; DAVIES, 1988). Seu uso pode causar diversos distúrbios, bem como a elevação de testosterona em fêmeas, inibição de aromatasas e do desenvolvimento larval e perturbações reprodutivas (OBERDÖSTER; McCLELLAN-GREEN, 2002; CASTRO; RODRIGUES-QUEIROZ; ROCHA-BARREIRA, 2007; ABIDLI et al., 2012; TITLEY-O'NEAL, et al., 2013). Nestes animais, a contaminação por COE's, induzidas por baixas concentrações de TBT, provoca um fenômeno chamado de imposex, um bioindicador caracterizado pela masculinização de fêmeas, com o desenvolvimento de um pênis e vaso deferente (SANTOS et al., 2011).

Outro bom bioindicador para contaminação por COE 's é o intersex. Relacionado a altos níveis de contaminação por TBT (DE WOLF et al., 2004), essa síndrome é caracterizada pelo distúrbio fenotípico no trato reprodutivo, com a transformação gradual de órgãos reprodutivos femininos em estruturas morfológicamente masculinas (COSTA, 2012).

Além disso, os manguezais possuem a característica de apresentar uma resposta sensível ao menor distúrbio externo, sendo considerado um bom bioindicador para detectar e monitorar mudanças no nível do mar em escalas local e regional (SHAEFFER-NOVELLI; CINTRON-MOLERO; SOARES, 2002).

Há apenas um registro no Brasil de estudos em manguezal para intersex, utilizando com *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) (COSTA, 2012). Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência de alterações morfológicas causadas por TBT em uma espécie nativa e típica de manguezal, bem como aprofundar o conhecimento sobre as alterações provocadas nessa espécie, realizando um monitoramento da contaminação por TBT, utilizando intersex como bioindicador nos municípios de Vitória, Serra, Vila Velha e Cariacica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AMBIENTE DE ESTUDO

Os estuários estão entre os ecossistemas aquáticos mais importantes em termos de importância ecológica e econômica (KENNISH, 1997). Os manguezais, por serem ecossistemas estuarinos, são ambientes de transição entre os ambientes fluviais e marinhos (PERILLO, 1996). Além disso, são considerados verdadeiros berçários biológicos (SHAEFFER-NOVELLI, 1995), abrigando espécies típicas desse ecossistema, ou aquelas que ali passam pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (MACIEL, 1991).

Ambiente característico de regiões tropicais e subtropicais, os manguezais são ambientes produtivos, que contribuem para a fertilidade das águas costeiras, devido a grande produção e exportação de matéria orgânica, transformação do material foliar e utilização deste como alimento para um grande número de organismos (ODUM; HEALD, 1975).

Os manguezais possuem características marcantes que os fazem estruturalmente e fisiologicamente únicos. A morfologia e as adaptações ecofisiológicas das árvores de manguezais incluem raízes aéreas, dispersão de propágulos, madeira estreita com ausência de anéis de crescimento, mecanismos de retenção de nutrientes, alta resistência a variações de salinidade e capacidade de retenção de água e carbono (ALONGI, 2002).

Os manguezais ocupam, mundialmente, uma área total estimada de 181.000 km² (SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997). Biogeograficamente, as regiões mais diversificadas estão localizadas no Pacífico Indo-Oeste, que compreende as regiões da Indonésia, Brasil e Nigéria, representando aproximadamente 43% das florestas de manguezais do mundo (ALONGI, 2002).

Os bosques de manguezais são arquitetonicamente simples em comparação com florestas tropicais, geralmente não possuem um sub-bosque de samambaias e são normalmente menos ricos em espécies do que as outras florestas tropicais (ALONGI, 2002).

Os diferentes tipos de vegetação resultam em diferenças nas correntes das marés (WOLANSKI; RIDD, 1986) e no transporte de sedimentos dentro do bosque (ALONGI, 1987). Nas zonas de maré baixa e média, há uma predominância de

sedimentos argilosos e finos, que se desenvolvem em associação com pneumatóforos e raízes de *Avicennia* e *Rizophora*, já na zona de maré alta, sedimentos mais grossos, como areia, predominam (BOTO; WELLINGTON 1984, ALONGI, 1987).

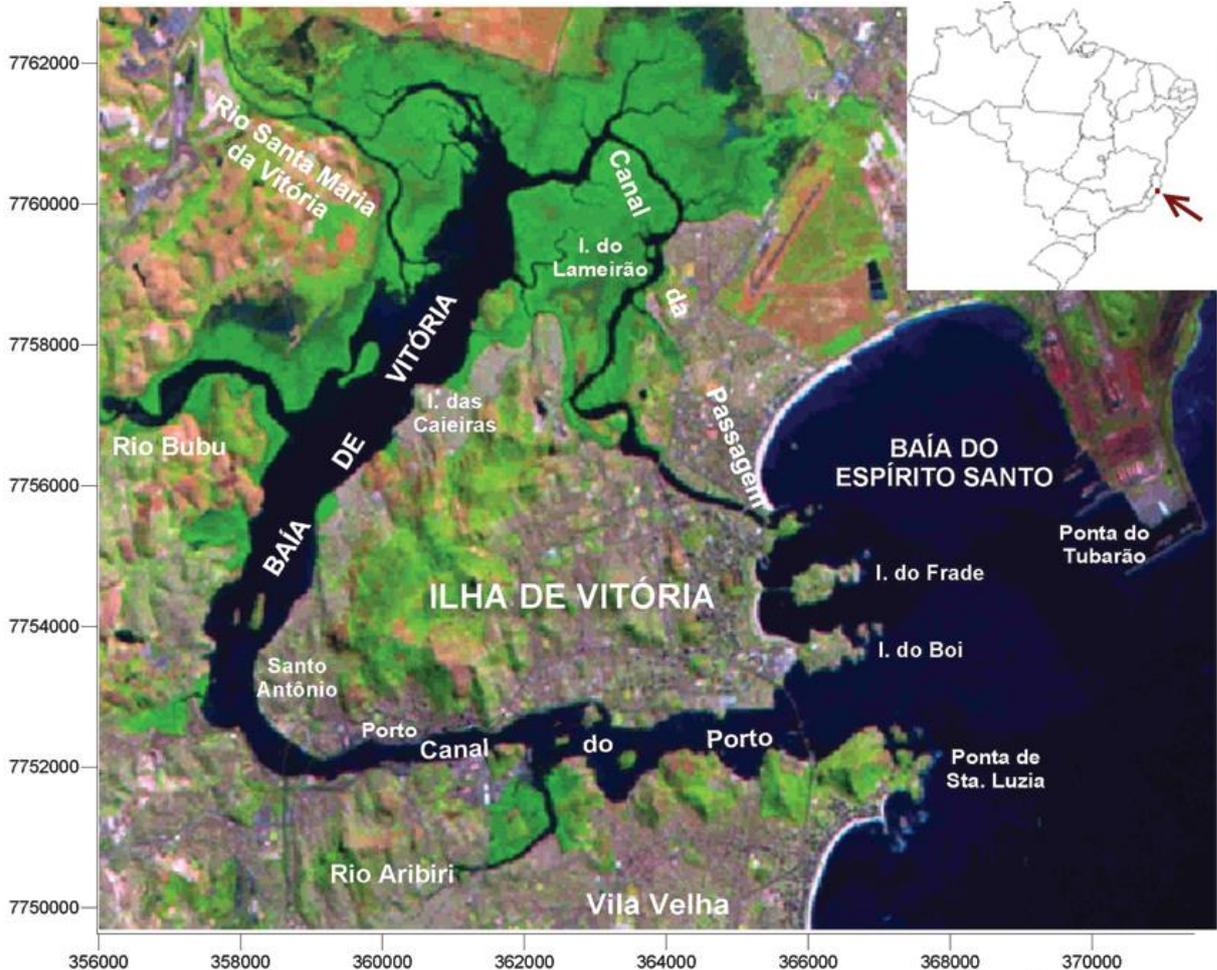
A destruição dos manguezais está diretamente relacionada com o crescimento e desenvolvimento urbano, principalmente em relação à aquicultura, mineração e superexploração da madeira, peixes, crustáceos e moluscos (ALONGI, 2002). A Baía de Vitória (20°23'S - 40°20'W) é uma região de extrema importância sócio-econômica no Estado do Espírito Santo, e a forte degradação dos manguezais tem sido promovida pela ocupação populacional em seu entorno, aterros, implantação de indústrias e atividades portuárias (ALMEIDA, 2007).

A Baía de Vitória (Figura 01) possui dois canais principais de comunicação com o mar: o Canal da Passagem e o Canal do Porto (DASMACHIO, 2008; JUNIOR et al., 2009). Esse sistema apresenta uma grande complexidade morfométrica, condicionada pela presença de afloramentos rochosos, junto aos rios Santa Maria (de porte médio), rio Formate-Marinho, Bubu, Aribiri, Córrego Piranema e o Canal da Costa (ambos de pequeno porte) (DALMASCHIO; TEIXEIRA; GARÇÃO, 2008; VERONEZ JUNIOR; BASTOS; QUARESMA, 2009).

Quanto à classificação hidrodinâmica, o rio de maior contribuição com volume de água doce é o rio Santa Maria (15,7 m³/s) (RIGO, 2004), e a Baía possui características de “estuário dominado por maré”, no qual a energia da corrente de maré excede a energia da onda na boca dos estuários (DALMASCHIO, 2008).

O sistema estuarino da Baía de Vitória tem sofrido ao longo de várias décadas uma forte degradação ambiental, devido à ação antrópica exercida desde a chegada dos primeiros colonizadores e nas explorações por eles iniciadas, até os dias de hoje (CITRÓN; NOVALLI, 1992). Além do município de Vitória, a Baía de Vitória também recebe contribuições antrópicas de outros três municípios circunvizinhos (Vila Velha, Cariacica e Serra) (JESUS et al., 2004).

Figura 01. Localização do sistema costeiro da Baía de Vitória, ES.



Fonte: VERONEZ JUNIOR et al., 2009.

A colonização portuguesa no estado teve seu início em 1535 (DERENZI, 1965). Com o aumento da urbanização, os manguezais foram vistos como ambientes propícios ao desenvolvimento de epidemias, e se tornaram mal vistos pela população (TULLI; SANTOS; LOUZADA, 2009). O primeiro aterro planejado de um manguezal da Baía de Vitória iniciou-se em 1817, no manguezal de Campinho (TULLI, SANTOS; LOUZADA, 2009). De 1960 a 1980, a população da Ilha de Vitória cresceu abruptamente, e esse novo contingente populacional, devido à falta de emprego causada pela crise do café (década de 1960), buscavam empregos no setor portuário, industrial e na construção civil, e se distribuiu em áreas baratas e pouco seguras: encostas de morros e manguezais, que sofreram aterros nos anos seguintes (TULLI; SANTOS; LOUZADA, 2009; FERREIRA, 1989). Em 1989, a Prefeitura Municipal deu início a um projeto de contenção a invasões, o que encerrou a ocupação desregulada dos manguezais da Baía de Vitória (ALVES, 2004).

Apesar de todos os impactos ambientais, os manguezais são ecossistemas amparados por lei, e constituem áreas de preservação permanente segundo a Lei Federal nº 4771 de 15 de setembro de 1965 (EYSINK et al., 1998). No município de Vitória, em 1986 foi criada a Estação Ecológica Municipal da Ilha do Lameirão, que tem como objetivo a preservação da natureza e a realização de pesquisas científicas, que dependem da autorização prévia do órgão responsável pela administração da unidade (TULLI, 2009).

“Ao contrário do passado, hoje, compreende-se a relevância desse ecossistema e a necessidade de protegê-lo, fazendo-se necessário um monitoramento intensivo e manejo apropriado deste recurso” (ALMEIDA, 2007).

2.2 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS (COE's)

A contaminação marinha por poluentes químicos é decorrente da ação antrópica direta ou indireta, e os ecossistemas marinhos são os receptores temporários ou finais dessa poluição (MORAES et al., 2001).

O emprego de substâncias anti-incrustantes em embarcações é justificado devido ao fato de que qualquer superfície, quando submersa, está sujeita a incrustações e essas, em cascos de navios, resultam em rugosidades, que conseqüentemente aumentam o atrito com a água, resultando em perda de velocidade, maior gasto de combustível, dificultam o funcionamento de motores e caixas de mar; isso gera um aumento na frequência de docagens e um aumento de custos e resíduos gerados, bem como na introdução de espécies exóticas em ambientes aquáticos (MARINHA DO BRASIL, 2007; KOTRIKLA, 2009).

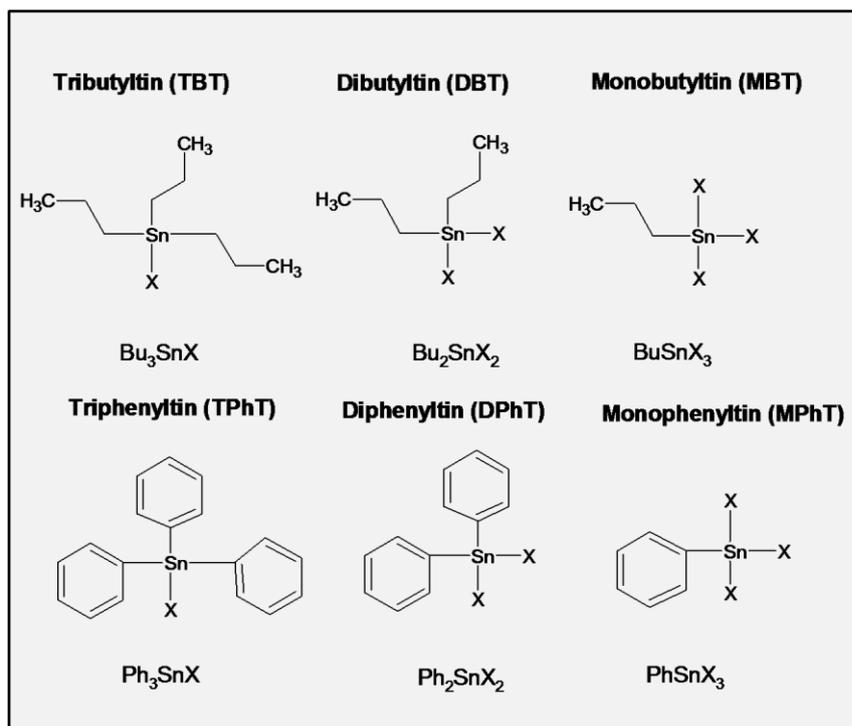
Os primeiros registros do uso de algum tipo de anti-incrustante foi por volta de 1500 a.C. a 300 a.C. pelos fenícios, que faziam uso de tiras de cobre pregadas nos cascos de suas embarcações, para inibir a proliferação de organismos incrustantes (*fouling*), tais como cracas e algas, pois perceberam que, quanto mais suave o fundo das embarcações, era mais fácil e rápido velejar, pois a demanda de gasto energético para tal era menor (CHAMP; PUGH, 1987). Há também registros do uso de chumbo como anti-incrustante entre os séculos XVII e XVIII, mas o cobre se mostrou mais eficiente (CHAMP; PUGH, 1987).

Existem três tipos de tintas anti-incrustantes: (1) Convencional ou de "associação livre", em que os biocidas estão soltos na tinta e são liberados por lixiviação na água circundante; (2) matriz solúvel e ablativo, e (3) copolímeros de polimento (BAALS, 1987; CHAMP; PUGH, 1987). Os tipos 1 e 2 são referidos como tintas convencionas, ambos utilizam o biocida na forma de livre associação (CHAMP; PUGH, 1987). O tipo 3 foi desenvolvido no início da década de 1970, é uma tinta hidrofílica, que corrói aos poucos, permitindo um longo intervalo entre docagens e, devido a sua grande eficácia e alta qualidade de acabamento, é bastante utilizada entre iatistas (BAALS, 1987).

Compostos a base de arsênico e/ou mercúrio foram muito usados, porém, muito antes da descontinuação do seu uso 1970, em 1853, surgiram os primeiros compostos orgânicos à base de estanho (CHAMP; PUGH, 1987; MARINHA DO BRASIL, 2007; SANTOS et al., 2011).

Compostos organoestânicos (Figura 02) pertencem a uma classe de organometálicos de poluentes, são eles: Tributilestanho (TBT), Dibutilestanho (DBT), Monobutil-estanho (MBT), Trifenilestanho (TPhT), Difenilestanho (DPhT) e Monofenil-estanho (MPhT) (SANTOS et al., 2011).

Figura 02. Compostos Organoestânicos (COE's)



Fonte: SANTOS et al., 2011.

Compostos organoestânicos (COE's ou OTs), principalmente os triorganoestanhos e particularmente o tributileno (TBT) são contaminantes onipresentes em ecossistemas marinhos e de água doce, devido a sua vasta utilização em produtos industriais e de consumo, incluindo biocidas em tintas anti-incrustantes em navios, barcos e instalações *off-shore*, pesticidas agrícolas, conservantes materiais, catalisadores em vários materiais (p. ex. poliuretano), PVC e outros plásticos, e tem sido usados desde o início dos anos 1970. (RISTEMA; LAANE, 1991; BAUER et al., 1997; MORCILLO; PORTE, 1998; DAHLLOF et al., 2001; FERNANDEZ, 2004; ANTIZAR-LADISLAO, 2008; CHOI et al., 2013).

Contudo, organismos marinhos não-alvo são afetados por esses compostos organoestânicos que causam uma série de efeitos deletérios aos mesmos devido a sua alta toxicidade, alta persistência no ambiente e transferência ao longo da cadeia trófica (LIMA et al., 2006). O TBT se mostrou prejudicial a diversos organismos, desde algas, crustáceos, esponjas, equinodermos, peixes, répteis, mamíferos e aves marinhas, e aos seres humanos, ao ingerirem alimentos contaminados. (AXIAK et al., 2000; FAFANDEL; MULLER; BATTEL, 2003; JENSEN; HOLMER; DAHLLOF, 2004; FERNANDEZ et al., 2006; CASTRO; RODRIGUES-QUEIROZ; ROCHA-BARREIRA, 2007; MARINHA DO BRASIL, 2007).

No final dos anos 1960 e no início da década de 1970, relatos associaram o uso do TBT à queda da produção de juvenis e alterações nas conchas de ostras da espécie *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), levando a um declínio de sua produção (ALZIEU, 1986). No mesmo período, trabalhos realizados no Reino Unido, ligaram TBT à disrupções endócrinas no gastrópode *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758) (COSTA, 2012). O mais importante dos efeitos dos COEs sobre o ambiente marinho é a sua ação como desregulador endócrino e, em moluscos, o TBT causa imposex, intersex e ovotestis, causando falência reprodutiva em gastrópodes (OEHLMANN et al., 1998; COSTA, 2012). Dentre esses efeitos, o imposex é o mais bem estudado, pois afeta cerca de 2000 espécies de gastrópodes no mundo todo (STERNBERG et al., 2008).

2.3 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS E SEUS RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA

Sekizawa et al. (2003) e Strand e Jacobsen (2005) falam da elevada toxicidade do TBT para moluscos e seus efeitos peculiares altamente específicos, além da capacidade de rápida bioacumulação, esses fatores levantaram preocupações sobre seus efeitos tóxicos em seres humanos, pois moluscos são comercializados e empregados na alimentação (ARAÚJO; ROCHA-BARREIRA, 2005; BOEHS; ABSHER; CRUZ-KALED, 2008).

Devido a esses fatores associados a outras características tóxicas desse composto, a Organização Marítima Internacional (IMO) lançou um tratado global que proíbe a aplicação de tintas à base de TBT a partir de 1 de Janeiro de 2003, tendo sua proibição total em 1 de Janeiro de 2008 (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Os efeitos biológicos dos compostos organoestânicos têm sido descritos em diversos países (BRYAN; GIBBS, 1991; MORCILLO; PORTE, 1998; HALLERS-TJABBES; KEMP; BOON, 1994; COSTA, 2012), sempre relacionados a atividades navais como portos, estaleiros e marinas, e concentrações relativamente altas de COE's tem sido detectados (FERNANDEZ et al., 2006).

A principal via comum de exposição para os seres humanos, além de outros animais, é pelo consumo de mariscos (SEKIZAWA et al., 2003). Alimentos contaminados com TBT podem impor um risco para as populações locais e afetar a indústria do turismo (SWENNEN; SAMPANTARAK; RUTTANADAKUL, 2009).

Schweinfurth e Günzel (1987) relataram que compostos de TBT podem causar graves irritações na membrana da pele e das mucosas, por isso, contato com a pele e os olhos e a inalação da névoa ou poeira devem ser evitados. Alzieu (1998) ainda diz que, com a exposição constante, essas irritações podem levar a dermatites severas. Em estudos de dose repetida, linfotoxicidade e toxicidade hepatobiliar são os achados predominantes (KOTRIKLA, 2009).

Alguns trabalhos tem evidenciado os riscos desses compostos para a saúde humana em indivíduos que vivem 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 timócitos (KASS; ORRENIUS, 1999).

Com o aumento na 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 (FORSYTH; JAY, 1997; AZENHA; VASCONCELOS, 2002; CHIEN et al., 2002). 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),

Com o aumento da preocupação com a contaminação e exposição de seres humanos ao TBT, foi criado um índice para medir o nível de contaminação (FERNANDEZ et al., 2006).

O modelo do Quociente de Risco deriva da seguinte expressão:

$$RQ = EF \times ED_{tot} \times Ring \times C \times 10^{-3} \\ Dref \times BWad \times ETmed$$

Os parâmetros são:

RQ = Quociente de Risco

EF = Frequência de exposição = 365 d/a

ED_{tot} = Duração da exposição = 70 anos

Ring = Taxa de ingestão = g/d

C = Concentração de TBT = (peso úmido) mg/g

Dref = Dose referência = 3x10⁻⁴ mg/kg/d

BWad = Peso corporal, adulto = 70kg

ETmed = Tempo de exposição (média) = 365 d/a x 70 anos

Os valores encontrados no Brasil, para o consumo de moluscos (0,027 a 0,026) são maiores que os encontrados nos Estados Unidos (0,004) e menores que os encontrados em Taiwan (0,902) (FERNANDEZ et al., 2006). Para pescadores artesanais, no Brasil, os valores encontrados (1,005) estão próximos ao limite de risco (1,0), são novamente maiores que os encontrados nos Estados Unidos (0,095 no pior cenário) e menores que os relatados em Taiwan (1,602, chegando a 3,713 nos piores cenários) (FERNANDEZ et al., 2006).

No entanto, apesar das evidências de que as referidas fontes expõem seres humanos a COE's, os dados disponíveis sobre a contaminação por TBT em humanos são limitados (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Assim, as principais pesquisas relacionadas a esse tipo de contaminação, tem sido realizadas a partir de estudos imunológicos em ratos, para testar a toxicidade desse contaminante e diferenças inter-individuais (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Estudos realizados no Japão (TSUDA et al., 1995) mostraram que frutos do mar comercializados em mercados comuns apresentaram altas concentrações de TBT (185 ng). Em Kuopio, Finlândia (RANTAKOKKO et al., 2006) foi encontrado o maior número de compostos organoestânicos diferentes em peixes e frutos do mar de mercado. Os compostos predominantes foram: TBT, MBT, TPhT, DBT e TPhT, medidos em níveis até 2,53, 1,52, 1,11, 0,25 e 0,14 ng respectivamente.

O perigo representado por COE's para seres humanos depende não só da solubilização, mas também da possibilidade de degradação dos compostos durante a digestão, visto que o padrão de permeabilidade se relaciona com o padrão geral de toxicidade *in vivo* (triaquilestanho > diaquilestanho >> monoquilestanho), mas há diferenças de acumulação entre os compostos (DBT > TBT > MBT) (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Em testes gastrointestinais *in vitro*, usando um extrato preparado, visando imitar o início da absorção gastrointestinal de butilestanho em seres humanos, observou-se que a degradação mais importante foi a de DBT para produzir MBT (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2005). Além disso, foi observado que o processo de cozimento não degrada o butilestanho, o que faz com que os resultados sejam ainda mais significativos (MASSANISSO et al., 2003).

Os sedimentos contaminados por TBT continuam sendo a maior preocupação para a comunidade científica. É fato que se fazem necessárias novas tecnologias sustentáveis para remover o TBT acoplado ao sedimento, novas pesquisas sobre toxicidade experimental, ingestão dietética e potenciais efeitos na saúde humana (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Atualmente, mudanças climáticas são as maiores preocupações mundiais, tanto ambientalmente quanto economicamente, tendo em vista que essas mudanças, em ambientes costeiros, afetam a temperatura da água, salinidade, radiação solar, CO₂ dissolvido, pH e podem afetar diretamente na toxicidade do TBT (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

2.4 IMPOSEX

Um efeito característico destes compostos desreguladores endócrinos, e que afetam principalmente os moluscos marinhos da classe Gastropoda, se manifesta pelo desenvolvimento do imposex, que consiste no aparecimento de características sexuais masculinas (OEHLMANN et al., 1998). Essa síndrome pode impedir a reprodução nas fêmeas podendo levar ao desaparecimento da espécie por falta de recrutamento ou morte das fêmeas afetadas, tanto em escala local como regional (BRYAN et al., 1986; GIBBS; BRYAN, 1987) e é considerada um caso clássico de desregulação endócrina (MATTHIESSEN; GIBBS, 1998). Uma vez que o imposex surge um comportamento dose-resposta, a magnitude do desenvolvimento dos caracteres masculinos pelas fêmeas depende da concentração ambiental do poluente (GIBBS; BRYAN, 1996; ALZIEU, 2000).

Devido a diferenças na sensibilidade a esses compostos, nem todas as espécies sofrem o mesmo grau de masculinização (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). Este desenvolvimento é espécie-específico, e a sensibilidade aos poluentes também é diferencial (STROBEN et al., 1995).

Existem vários mecanismos propostos para explicar essa disrupção endócrina (HORIGUSHI et al., 1994; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998), incluindo a inibição da aromatase (SPOONER et al., 1991; BETTIN; OEHLMANN; STROBEN, 1996;

SANTOS et al., 2005), a inibição da excreção da testosterona (RONIS; MASON, 1996), a disrupção do sistema neuroendócrino (FÉRAL; LAGALL, 1983) e a hipótese do neuropeptídeo APGWamide (OBERDÖSTER; MCCLELLAN-GREEN, 2000, 2002). Dentre essas, a hipótese da inibição da aromatase tem recebido maior atenção (SPOONER et al., 1991; BETTIN et al., 1996; OEHLMANN et al., 1996) e propõe que a ação do Citocromo P450, o qual está envolvido na conversão da testosterona em 17 β -estradiol, cuja interrupção eleva os níveis de testosterona em fêmeas, induzindo caracteres masculinos (LEUNG et al., 2006).

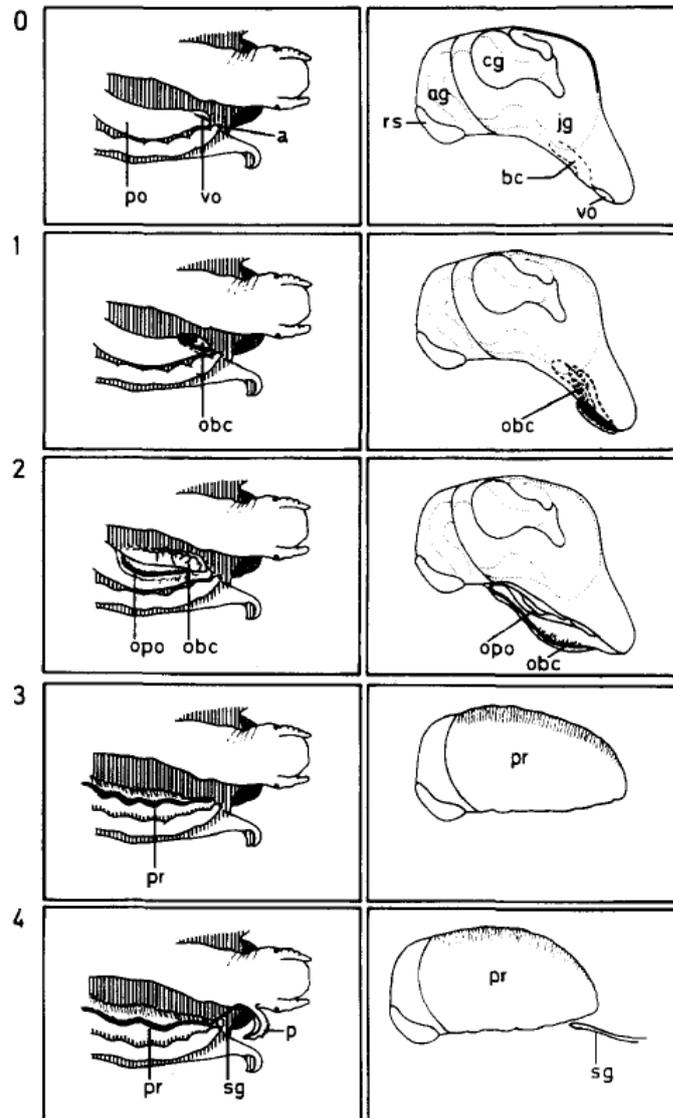
2.5 INTERSEX

Observado pela primeira vez no litoral da Alemanha (BAUER et al., 1995, 1997), quando foram evidenciadas mas formações no trato reprodutivo palial de fêmeas do gastrópode *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758), tornando-se outro importante bioindicador para TBT por estar relacionado a altos níveis de contaminação (10 ngL⁻¹ Sn) (DE WOLF et al., 2004).

Segundo Bauer et al. (1995), Intersex é uma síndrome que se caracteriza pelo distúrbio fenotípico no sistema reprodutivo, com a transformação gradual de órgãos reprodutivos paliais femininos em estruturas morfológicamente masculinas, classificada em cinco estágios (0-4) (Figura 14).

- Estágio 0: fêmea encontra-se normal, sem indícios de intersexualidade.
- Estágio 1: a abertura genital feminina é aumentada por uma fenda proximal e a bursa copulatrix é dividida ventralmente.
- Estágio 2: ocorre a divisão da porção ventral do oviduto palial, expondo os lobos internos. A próstata nos machos é caracterizada por um sulco aberto, portanto, essa característica deve ser interpretada como sendo do sexo masculino.
- Estágio 3: as glândulas do oviduto palial são totalmente, ou em parte, suplantada por uma glândula prostática.
- Estágio 4: o pênis e o sulco seminal são formados. As fêmeas nesse estado não apresentam espermiogênese.

Figura 14. Esquema de desenvolvimento de intersex para *Littorina littorea* com quatro diferentes estágios. Vistas dorsal com cavidade do manto aberta (esquerda) e vista lateral da seção palial do trato genital (direita). a - ânus; ag - glândula do albúmen; bc – bursa copulatrix; cg - glândula da cápsula; jg - glândula do albúmen; obc – bursa copulatrix aberta; obo - oviduto palial aberto; p - pênis; po - oviduto palial; pr - próstata; rs - receptáculo seminal; sg - canal espermático; vo - abertura genital.



- Fonte: BAUER et al., 1997.

2.6 LITTORINIDAE

Sistemática: Mollusca^P, Gastropoda^C, Prosobranchia^{SC}, Caenogastropoda^O, Mesogastropoda^{SO}, Littorinoidea^{SF}, Littorinidae^F.

2.6.1 Mollusca^P

“Os primeiros vestígios de vida na Terra são apontados em escavações de rochas de três bilhões de anos” (THOMÉ et al., 2010). Os primeiros moluscos datam de aproximadamente 570 milhões de anos (Período Cambriano, era Paleozóica) (THOMÉ et al., 2010).

No Brasil, existem registros de moluscos fósseis desde o período Siluriano (era Paleozóica) até o Holoceno (era Cenozóica), com ocorrências registradas desde o Acre até o Rio Grande do Sul. São conhecidas cerca de 1200 espécies de moluscos fósseis (descritas ou referenciadas) com ocorrência no Brasil, das quais 35,9% são gastrópodes, 51,3% são bivalves, 11,7%, cefalópodes e 1% de outras classes menores (THOMÉ et al., 2010, p. 25).

Mollusca é o segundo maior táxon do reino Metazoa, composto por sete classes (Aplacophora, Monoplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, Cephalopoda, Bivalvia e Scaphopoda) (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). São invertebrados, não segmentados, de corpo mole, em geral protegidos por uma concha calcária externa, pé muscular, possuem uma cabeça, boca e órgãos dos sentidos, e uma massa visceral, a qual contém a maior parte do trato intestinal, coração, gônadas e rim (RUPERT; FOX; BARNES, 2005; THOMÉ et al., 2010).

2.6.2 Gastropoda^C

Das sete classes admitidas para o filo dos moluscos atualmente, este trabalho aborda somente uma delas: a classe Gastropoda, representada por caramujos, caracóis e lesmas.

Gastrópodes são moluscos assimétricos com concha em uma única peça, geralmente enrolada em espiral, na qual o corpo pode ser retraído; concha perdida ou reduzida em vários grupos; durante o desenvolvimento, a massa visceral e o manto sofrem rotação de 90-180° em relação ao pé (torção), portanto a cavidade do manto localiza-se anteriormente ou no lado direito, e o tubo digestivo e o sistema nervoso são torcidos; alguns táxons sofreram reversão parcial ou total da rotação (destorção); com um pé muscular rastejador (modificado em alguns táxons nadadores e escavadores); cabeça com estatocisto e olhos (frequentemente reduzidos ou perdidos) e 1-2 pares de tentáculos; a maioria com rádula complexa e estilete cristalino, este último perdido na maioria dos grupos predadores; 1-2 nefrídios; o manto (=pálio) geralmente forma uma cavidade que abriga ctenídios, osfrádios e glândulas hipobranquiais; ctenídios às vezes perdidos e substituídos por estruturas secundárias com função respiratória (BRUSCA; BRUSCA, 2007, p. 733).

2.6.3 Prosobranchia^{SC}

Os Prosobrânquios recebem esse nome devido à condição de suas brânquias, que estão localizadas anteriormente em relação ao coração, pelo padrão estreptonêurico do sistema nervoso e por terem sexos separados (dioicos) (LEME, 1995). Já foi considerado um grupo monofilético (RUPERT; FOX; BARNES, 2005).

A maioria dos integrantes desse grupo, com exceção de Titiscaniidae, possuem conchas (LEME, 1995). Possuem cavidade do manto anterior, e a maioria tem opérculo, e o átrio direito foi perdido em grande parte das famílias (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). Os prosobrânquios são táxons de habitat marinho bentônico, embora haja representantes de água doce e terrestres (RUPERT; FOX; BARNES, 2005).

A subclasse era dividida em três ordens fundamentadas em um conjunto de estruturas e fenômenos de complexidade menor ou maior: Archaeogastropoda, Mesogastropoda e Neogastropoda (LEME, 1995), até que em 1960 ordem Caenogastropoda foi introduzida por Cox (1960), e as ordens supracitadas passaram a ser subordens.

2.6.4 Caenogastropoda^O

Caenogastropoda é o grupo de gastrópodes marinhos dominante em termos de número de espécies, diversidade de hábitos e habitats e importância ecológica (COLGAN; HUTCHINGS; BRAUNE, 2006). Inclui dois grandes grupos de sucesso evolutivo, os Mesogastropoda e os Neogastropoda (RUPERT; FOX; BARNES, 2005) divididos em cerca de 136 famílias viventes (65 famílias extintas) e 41 superfamílias (BOUCHET; ROCROI, 2005).

O grupo inclui as espécies marinhas mais importantes comercialmente, bem como vários grupos que tem independentemente alcançado o ambiente dulcícola e terrestre (COLGAN et al., 2006). Muitas vezes exibem conchas com morfologias convergentes (enrolada, desenrolada, globosa, alongada, achatadas em forma de pratos, etc.) e ocupam uma grande variedade de habitats (epifaunal bentônico ou

escavadores, pelágicos, nadadores ativos, detritívoros, sedentários, herbívoros, carnívoros, pastadores, ectoparasitas ou endoparasitas) (COLGAN et al., 2006).

Grupo parafilético (HASZPRUNAR, 1988; PONDER; LINDBERG, 1997) inclui os (1) Architaenioglossa, que contém os Cyclophoroidea, o maior grupo de caracóis terrestres, e as famílias Ampullariidae e Viviparidae, de água doce; (2) os mesogastrópodes marinhos restantes: Littorinidae, Cypraeidae, Cerithiidae, Calyptraeidae, Tonnidae, Cassidae, Ranellidae, Strombidae, Naticidae e Heteropoda; e os (3) Stenoglossa (Neogastropoda), grupo quase exclusivamente marinho e carnívoro, que contém as famílias economicamente mais importantes conhecidas atualmente: Muricidae, Volutidae, Mitridae, Buccinidae, Turridae e Conidae.

Possuem uma brânquia, um nefrídio e um átrio, e a posição das brânquias permite que esse grupo habite ambientes marinhos mais fundos (RUPERT; FOX; BARNES, 2005).

2.6.5 Mesogastropoda^{s0}

Embora os mesogastrópodes não sejam mais considerados um grupo monofilético, continua sendo usado para fins didáticos e seu conceito ainda é amplamente empregado (RUPERT; FOX; BARNES, 2005).

2.6.6 Littorinidae^F

Littoraria angulifera (Lamarck, 1822) é uma espécie neotropical que ocorre em florestas de mangue em ambos os lados do oceano Atlântico, vive sobre raízes amontoadas, nas zonas de maré alta (MERKT; ELLISON, 1998; THOMÉ, 2010). No Brasil, a espécie tem ocorrência do Ceará até Santa Catarina e em ilhas oceânicas (THOMÉ et al., 2010). É o único littorínídeo encontrado exclusivamente em manguezais (MERKT; ELLISON, 1998).

Variações ambientais e a variabilidade genética tem relação direta com a variação intraespecífica da morfologia das conchas de Littorínídeos (BERRY, 1961; NEWKIRK; DOYLE, 1975; JANSON, 1982a, b; COOK; CURREY; SARSAM, 1985; COOK, 1992; COOK; GARBETT, 1992; LEWIS; WILLIAMS, 1995; MILL; GRAHAME, 1995).

Em zonas de supralitoral e mesolitoral, os indivíduos são constantemente sujeitos ao estresse por dessecação, e possuem conchas bastante ornamentadas e com ranhuras; conchas menores, mais lisas e globosas tendem a ocorrer em populações de regiões de mesolitoral com uma maior frequência de ondas de alta intensidade; e conchas mais espiraladas tendem a ocorrer em ambientes mais protegidos; caramujos de populações de baixa densidade e com alimento abundante, crescem mais rápido e tendem a ter conchas arredondadas (NORTH, 1954; BERRY, 1961; VERMEIJ, 1973).

L. angulifera é ovovivípara, com estágio larval planctônico estimado de 8-10 semanas (GALLAGHER; REID, 1979). Indivíduos adultos ocorrem na zona de supralitoral em troncos, raízes, caules e folhas de mangue, principalmente em *Rhizophora mangle*, *Avicennia* spp., e *Laguncularia racemosa*, onde se alimentam de algas epífitas e fungos marinhos (KOHLMAYER; BEBOUT, 1986).

A protoconcha é geralmente alaranjada, caracterizada por possuir de 3 a 5 sulcos espirais proeminentes paralelos aos 2-4 espirais; as ranhuras principais aparecem no 1º ao 4º verticilo da concha, juntamente com as linhas de crescimento (estrias axiais), que normalmente, não estão de acordo com os padrões de distribuição espacial da superfície da casca (MERKT; ELLISON, 1998).

Quando presentes, os sulcos terciários, assim como os secundários, aparecem nas costelas entre os sulcos já existentes, geralmente as estrias em espiral começam entre a 4ª e a última volta do espiral da teleoconcha (MERKT; ELLISON, 1998).

Merkt e Ellison (1998) realizaram um estudo comparativo entre populações de *L. angulifera* de vários países em relação a distribuição geográfica e variação morfológica relacionada ao habitat e verificaram que há alterações no formato das conchas de diferentes regiões; as conchas do Atlântico Ocidental e do Caribe tem, comparativamente, espirais mais altos e aberturas mais circulares, a espessura da columela aumenta da região leste para o oeste, verificaram também que as conchas da Libéria e do Senegal foram atribuídas ao Atlântico Ocidental, e as conchas do Brasil foram atribuídas ao Atlântico Oriental, enquanto que as conchas do gabão foram atribuídas aos dois lados do Atlântico.

As variáveis morfológicas que mais contribuem para a discriminação, de acordo com a corrente predominante, foram as espirais/mm, altura do espiral, largura da

columela e circularidade da concha; assim, poderíamos identificar 75% das conchas de sítios associados ao norte equatorial atual, cerca de 71% da corrente equatorial sul, 66% da corrente do Golfo, 64% do Golfo do México e, 40% das paraíbas (MERKT; ELLISON, 1998).

Conchas de Príncipe, Gana, Serra Leoa, Nigéria e Angola se diferem das conchas de outras partes do mundo (Figura 2.3) devido ao seu espiral alongado e seus espirais são relativamente largos, em outras palavras, estes países possuem as conchas mais globosas, sendo que as conchas da Angola, Congo e Gabão possuem as aberturas mais circulares (MERKT; ELLISON, 1998).

O sistema reprodutivo de fêmeas de *Littoraria* spp. consiste, principalmente, em um ovário e um oviduto (MERKT; ELLISON, 1998). O ovário é representado por um sistema de túbulos de 55-80µm de diâmetro, junto à glândula digestiva (SYASINA; SHCHEBLYKINA, 2007) e inclui ovócitos e células auxiliares.

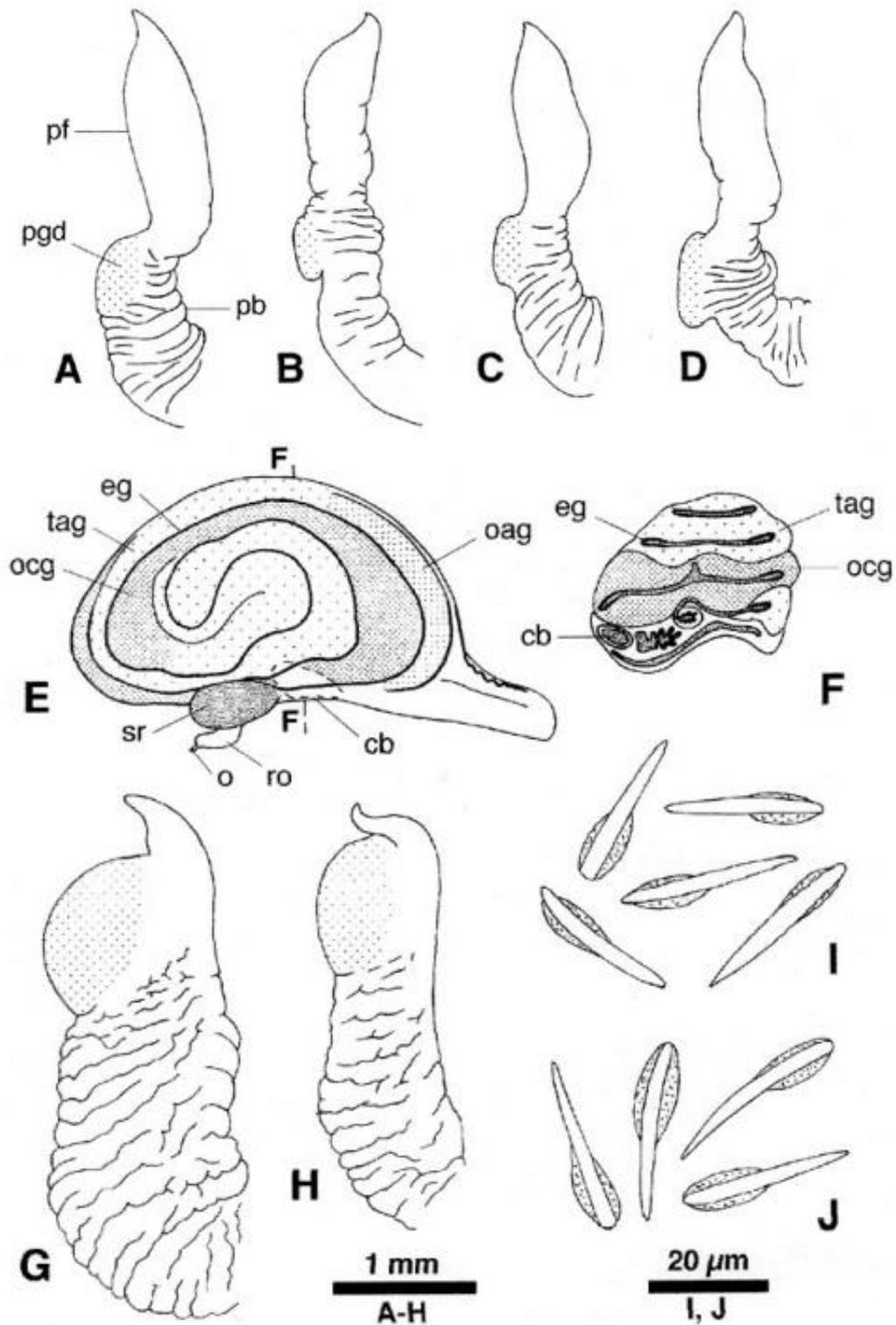
Um oviduto estreito, que quando contém ovos, apresenta coloração rosa e encontra-se em baixo da massa visceral, no lado direito (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). A região posterior do oviduto se abre no oviduto palial, que é branco opaco, e está localizado no lado direito do manto, composto pela glândula do albúmen e a glândula da cápsula (COSTA, 2012).

Os machos possuem um grande pênis de coloração escura (Figura 03), localizado acima do tentáculo cefálico direito (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). Na parte posterior da camada visceral, há um complexo testículo-glândula digestiva no ápice da concha (COSTA, 2012).

Seus lobos são intercalados entre os lobos da glândula digestiva, e os dois são de difícil distinção (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). “A próstata está localizada no lado direito da cavidade do manto, paralela ao reto e sua região anterior se abre em um canal peniano ciliado, que segue na direção do pênis” (COSTA, 2012). O pênis está localizado no lado direito posterior do tentáculo cefálico, e possui uma glândula discoide que é usada para apoiar as fêmeas durante a cópula (RUPERT; FOX; BARNES, 2005; COSTA, 2012).

Figura 03. Anatomia de *Littoraria ianthostoma* (A-F, I, J) e *Littoraria articulata* (G, H), Forsyth Creek, costa leste do Golfo de Joseph Bonaparte, território norte da Austrália (A-F, I, J, parátipos BMNH 20010109, 20010110; G, H, BMNH 20010112). A-D, G, H - Pênis. E - Oviduto palial (com vista do corte transversal em F). I, J -

Paraespermatozóide de dois espécimes. cb – bursa copulatrix; eg - ovócitos em espirais (linha preta mais grossa); oag - glândula do albúmen opaca; ocg - glândula da cápsula opaca; pb - base do pênis; pf - filamento peniano; pgd - glândula discoide; ro - oviduto renal; sr - receptáculo seminal; tag - glândula do albúmen translúcida.



2.7 CONTAMINAÇÃO POR COE's EM *Littoraria* sp.

A contaminação por organoestênicos vem sendo amplamente estudada (BAUER et al., 1997; CASEY; GRAVE; BURNELL, 1998; SUNDERMANN; BAUER; OEHLMANN, 1998; OEHLMANN et al., 1998; DAVIES; MINCHIN, 2002; COSTA, 2012).

Gammon, Turner e Brown (2005) verificaram a acumulação de Cu (cobre) e Zn (zinco) em partículas de tintas anti-incrustantes em *Littorina littorea*. Em cinco tratamentos diferentes (água do mar sem contaminação, água do mar contaminada, água do mar com *Ulva lactuca*, água do mar com *U. lactuca* contaminada e água do mar contaminada com tintas anti-incrustantes) e encontraram vestígios de Cu e Zn no pé, brânquias e no complexo glândula digestiva-gônada. Para a contaminação com Cu, foi encontrado cerca de $30\mu\text{g/g}^{-1}$ nos indivíduos de cada tratamento. Um acréscimo significativo da concentração de Cu foi observada no pé de indivíduos que estavam no tratamento com algas que não foram contaminadas previamente, mas os indivíduos tiveram contato direto com tintas anti-incrustantes. Concentrações elevadas de Cu nas brânquias foram observadas em todos os tratamentos no qual os indivíduos eram expostos diretamente a tintas anti-incrustantes, mas não foram observadas em tratamentos com alimentos contaminados. No complexo glândula digestiva-gônada, os maiores resultados para contaminação com Cu foram observados em tratamentos com alimento pré-contaminado. Para a contaminação com Zn, foi encontrado cerca de $50\mu\text{g/g}^{-1}$ no pé e no complexo glândula digestiva-gônada e cerca de $20\mu\text{g/g}^{-1}$ nas brânquias. Comparado com os grupos controle, foi observado um acréscimo significativo da concentração de Zn no pé no tratamento com tintas anti-incrustantes. Nas brânquias, foi observado um resultado acumulativo da concentração de Zn no tratamento com alimento contaminado, acompanhado de uma redução significativa da concentração de Zn no complexo glândula digestiva-gônada. Com esse trabalho, pode-se confirmar o poder de acumulação de Cu e Zn no organismo de *L. littorea*, apresentando diferenças entre a exposição direta ao contaminante e a ingestão de alimentos contaminados.

Sundermann, Bauer e Oehlmann (1998) verificaram as alterações na estrutura da próstata e da glândula da cápsula em machos e fêmeas de *Littorina littorea*, causadas pelo intersex. Em *L. littorea*, o gonoduto palial se origina ontogeneticamente do epitélio palial, em machos, essa estrutura permanece aberta e equipada com células de glândulas epiteliais, que, em espécimes adultos, funciona

como uma próstata. Existem aproximadamente cinco tipos de células glandulares facilmente distinguíveis. As células glandulares mais abundantes são as da glândula da próstata, que são fusiformes e delgadas; o plasma é preenchido com grânulos de secreção de coloração azul escuro. O complexo de Golgi se situa distalmente em relação ao núcleo, e possui numerosas vesículas membranosas. Os lisossomos também estão presentes nessa região. O Retículo Endoplasmático Rugoso se estende na lateral do corpo, entre os grânulos de secreção. A região basal do epitélio glandular é bem provida de nervos e células gliais. As fêmeas analisadas foram sexadas pela presença do ovário. No estágio 3 de intersex, o oviduto palial é totalmente ou parcialmente suplantado por uma glândula da próstata, se comparado ao estágio 4, a única diferença é a ausência do pênis. O oviduto, nas partes basais, a região proximal é um tubo fechado, e o epitélio está totalmente transformado em próstata. Os vestígios femininos são a bursa copulatrix, a glândula gelatinosa, a glândula da cápsula, a glândula do albúmen, e o receptáculo seminal. Na próstata feminina, as características epiteliais são exatamente idênticas as estruturas correspondentes do sexo masculino. Essas mudanças tornam a reprodução impossível.

Davies e Minchin (2002) verificaram a qualidade das medidas de imposex e intersex em gastrópodes marinhos. Para *Littorina littorea*, em relação à homogeneidade das amostras em diversos laboratórios. O ANOVA mostrou ser um teste confiável para verificar a homogeneidade, pois não foram encontradas diferenças nos níveis de significâncias em testes de laboratórios. Para a identificação do sexo, no laboratório de referência foi encontrado 51,4% de indivíduos do sexo masculino, em uma população de 440 indivíduos. Os outros laboratórios encontraram de 0% a 65% de machos e, apenas um laboratório apresentou diferenças significativas do laboratório referência. Em relação ao estágio de intersex (ISI), a média dos valores encontrados foi de 2,94 para 214 fêmeas analisadas, com um esperado de 0,5 para 80 indivíduos. Em relação ao comprimento da próstata, foram examinadas 208 fêmeas, e o comprimento médio da próstata foi de 5,01mm. A ANOVA indicou diferenças significativas entre os resultados de comprimento médio da próstata entre os laboratórios, e os demais laboratórios eram significativamente diferentes do resultado encontrado no laboratório referência. O desvio padrão calculado, a partir dos resultados do laboratório referência, é de 1,2mm. Se esse erro for considerado

aceitável, todos os laboratórios apresentaram resultados satisfatórios, com exceção dos dados avaliados como questionáveis.

Costa (2012) realizou em 2009 o primeiro trabalho de biomonitoramento de COE's em manguezais no Brasil utilizando *Littoraria angulifera*. Seu estudo foi realizado na em 20 pontos amostrais em áreas estuarinas, em substratos artificiais e costões rochosos, próximos a portos e marinas do Município de Vitória, Espírito Santo, e em uma área controle, localizada na Praia de Jacaraípe, Serra, ES. Na área controle, foram coletados 400 exemplares de *L. angulifera* e cerca de 40 exemplares em cada um dos pontos amostrais. Assim como no presente estudo, todos os indivíduos mediam acima de 10mm e foram considerados sexualmente maduros. Os animais foram transplantados para o laboratório, onde foram mantidos em aquários até serem anestesiados e analisados. No total, foram coletados 1119 exemplares de *L. angulifera*. Na área controle, dos 400 exemplares coletados, 248 eram fêmeas, sendo a razão sexual 0,65, indicando um desvio para fêmeas e, nenhuma delas apresentou sinais de intersex. Nos demais pontos, foram coletadas 243 fêmeas e, desse total, 51% estavam intersexadas. Os maiores valores de percentagem de intersex foram em locais próximos a portos, marinas e estaleiros de manutenção de pequenas embarcações. Em alguns pontos, apesar da proximidade com o Porto de Vitória, os indivíduos encontrados não estavam contaminados; pois essa região é de maior profundidade, o que impede que os moluscos entrem em contato direto com o sedimento e, como após a liberação no ambiente o TBT passa rapidamente para a fase particulada, ele tende a se acumular no sedimento rapidamente. Nos pontos de manguezal, onde a profundidade é menor e os moluscos tem contato direto com o sedimento, os índices de percentagem de intersex foram altos. Porém, alguns pontos apresentaram resultados variáveis. Assim como no presente estudo, todas as fêmeas intersexadas estavam estéreis. Os comprimentos de concha variaram de 19,44mm a 31,17mm. O ponto controle apresentou indivíduos relativamente pequenos, com média de comprimento de concha de 21,22mm, tal resultado pode ser explicado pelo fato desse ponto estar estabelecido sobre lateritos ferruginosos, e o comprimento de conchas está diretamente ligado a diferenças de habitat causadas por condições nutricionais, clima, estrutura da floresta e geomorfologia. Costa observou também que as fêmeas são significativamente maiores que os machos. Concluiu que espécies da família Littorinidas são mais tolerantes a altos níveis de

TBT, entretanto, *L. angulifera* se mostrou ser um sensível bioindicador para a contaminação por COE's, além de ser uma espécie amplamente distribuída e de fácil coleta. Concluiu também que a baía de Vitória e do Espírito Santo está sendo afetada negativamente pela presença de COE's . Entretanto, os resultados obtidos em áreas urbanizadas, próximas a portos, marinas e estaleiros, com maior profundidade, podem não estar correspondendo aos reais níveis de contaminação no local.

2.8 ESTRATÉGIAS DE BIOMONITORAMENTO

Monitorar os compostos organoestânicos no ambiente é relativamente fácil, pois além da variabilidade espacial e temporal dos *inputs* em cada local, em função do número e do porte das embarcações presentes, há também aspectos físicos, geológicos e biológicos (FERNANDEZ, 2001).

Durante a década de 1970, foram detectados os primeiros efeitos do TBT em ostras (organismos não-alvo), *Cassostrea gigas*, em cultivo comercial; tais efeitos consistiam em anomalias na reprodução, perda da fase de recrutamento e deformações nas conchas de indivíduos adultos (FERNANDEZ, 2001). A França foi o primeiro país a exercer controle sobre o TBT no ambiente, após efeitos similares terem sido detectados na Inglaterra e Espanha (ALZIEU et al., 1986).

Como essa espécie não é nativa da Europa ou da América faz-se necessário o transplante de indivíduos para locais onde se quer fazer o monitoramento, já que a espécie é reportada como a mais sensível para a contaminação por TBT (SMITH et al., 1987).

O Imposex é o método de biomonitoramento mais utilizado para medir a poluição por organoestânicos no mundo (FERNANDEZ, 2001). Existem várias formas de se avaliar o grau de imposex de uma população, seja pela frequência do fenômeno ou pelo VDSI (Índice de Sequência do Vaso Deferente), RPLI (Índice de Relação do Comprimento do Pênis) e RPSI (Índice de Relação do Tamanho do Pênis) (FERNANDEZ, 2001).

O percentual de fêmeas imposexadas é o índice mais fácil de aplicar, porque depende apenas de uma sexagem correta. [...] Os índices são aplicados da mesma forma, para mapear as áreas de maior contaminação por TBT, sendo a interpretação direta. A diferença entre eles é que enquanto o RPLI leva em conta apenas o comprimento do pênis, o RPSI

leva em conta o volume. O RPLI é mais adequado para áreas de contaminação moderada a alta, onde a diferença entre o comprimento do pênis dos animais imposexados é grande entre as estações. Nas áreas mais contaminadas, o pênis das fêmeas imposexadas aproxima-se e mesmo iguala-se ao tamanho dos pênis dos machos, aplica-se o RPSI. Nesta situação, o índice cúbico maximiza a diferença entre estações onde os animais tenham medidas próximas, e, portanto, permite uma melhor discriminação (FERNANDEZ, 2001, p. 27).

Há também técnicas de biomonitoramento envolvendo transplantes de espécies. Essa técnica pode ser empregada em locais onde uma determinada espécie, já conhecida por ser um bom bioindicador para determinado tipo de contaminação, não ocorra naturalmente e, para estabelecer relações de causa-efeito para uma espécie em estudos para bioindicação (FERNANDEZ, 2001). O método mais fácil e mais empregado é o transplante de ostras, uma vez que estes animais são facilmente cultivados (FERNANDEZ, 2001).

O monitoramento químico é trabalhoso e caro, em função da imensa demanda de análises que, muitas vezes, devem ser realizadas rapidamente. A água e o material particulado são os primeiros a receber influência de COE's, pois são liberados no momento em que entram em contato com a água (FERNANDEZ, 2001). Porém, a água é um meio extremamente energético, e recebe influência direta de escalas temporais curtas e longas, fenômenos naturais, variações de maré, regimes de chuva, etc. E, por isso, demanda uma grande quantidade de amostras para representar adequadamente a grande variabilidade temporal/espacial das concentrações dos compostos neste compartimento (FERNANDEZ, 2001).

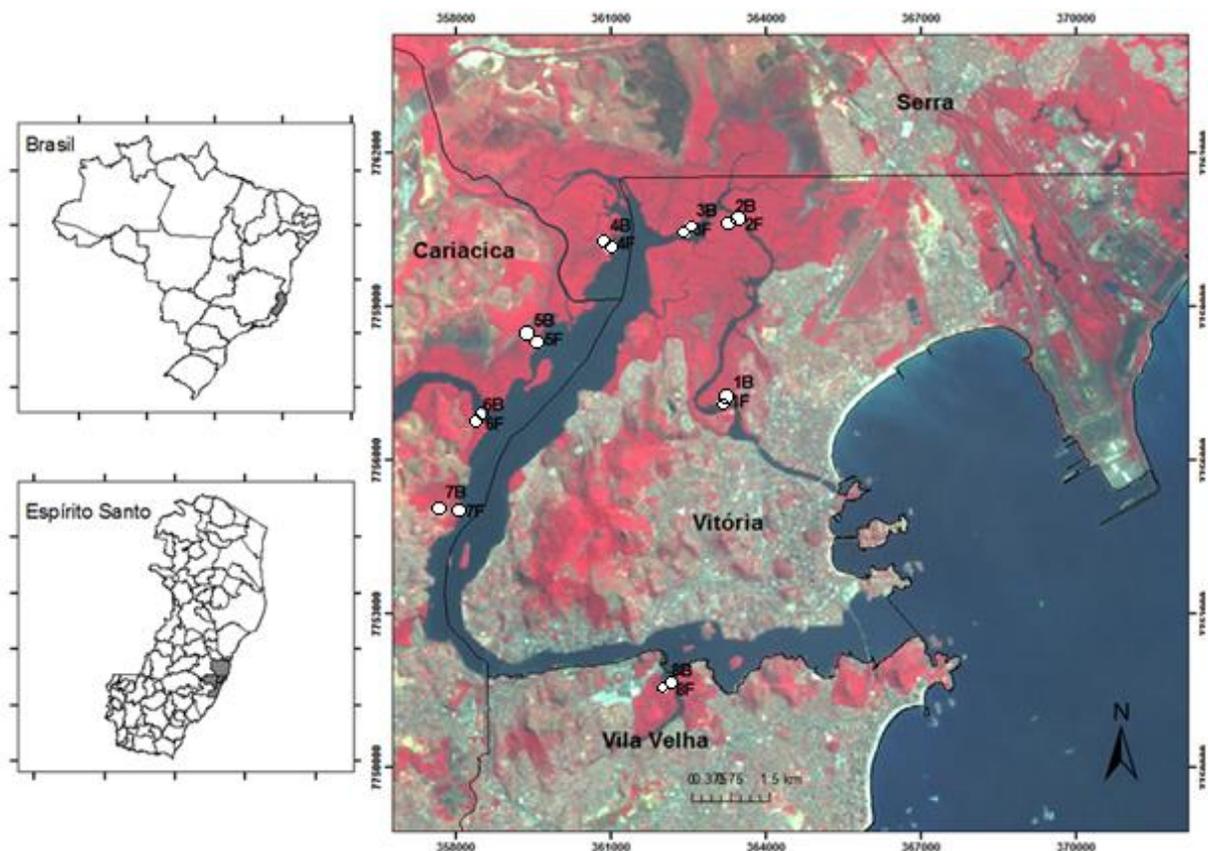
A análise de sedimentos pode ser utilizada para identificação, monitoramento e controle de fontes de poluição, especialmente para contaminantes que podem ser rapidamente adsorvidos pelo material particulado e assim, escapar à detecção pela análise da água. A distribuição vertical das concentrações de um contaminante nos sedimentos pode fornecer uma sequência histórica da intensidade de contaminação, bem como uma estimativa dos níveis naturais dos poluentes, quando existirem. Apenas a análise de sedimentos pode quantificar o estoque potencialmente mobilizável de um determinado composto em cada local específico, e assim, o potencial de risco associado à este composto ao longo do tempo. Por serem matrizes mais complexas, análises de sedimentos e organismos tendem a sofrer mais interferências que amostras de água, uma desvantagem que reduz um pouco o benefício obtido pela redução do número de amostras requerido para caracterizar estes compartimentos (FERNANDEZ, 2001, p. 38).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DEFINIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

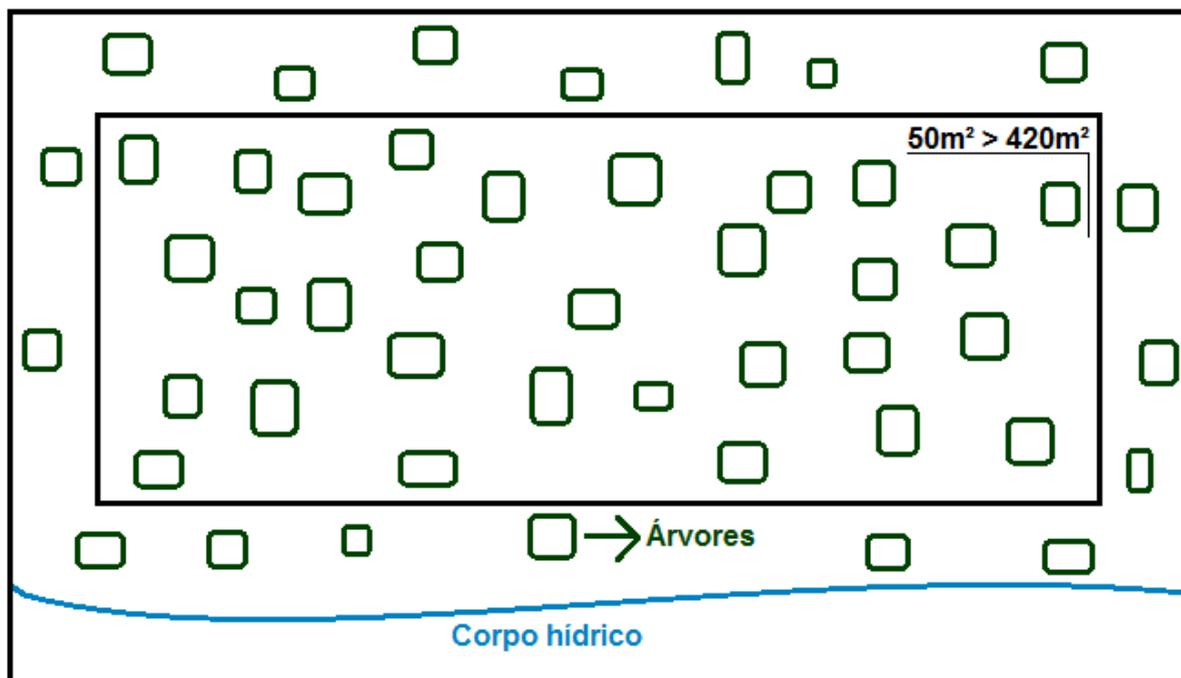
O presente estudo foi desenvolvido nos municípios de Vitória, Serra, Cariacica e Vila Velha, ES (Figura 10), por meio de coletas em oito pontos amostrais em áreas estuarinas. Foi realizada uma campanha prévia para definição das áreas de amostragem ao longo da Baía de Vitória e em cada bosque, foram estabelecidas parcelas considerando a frequência de inundação (franja e bacia), para comparação com outros estudos. Para cada fisionomia identificada no bosque de franja, foram definidas parcelas mais internas (bacias) localizadas na mesma posição longitudinal, resultando em 16 parcelas fixas. Essas parcelas foram delimitadas paralelas à linha de costa, em função da densidade do bosque, variando de 50 a 420 m² contendo pelo menos 30 indivíduos de mangue (Figura 11), adaptando a metodologia proposta por Cintron-Molero e Schaeffer-Novelli (1983) e Schaeffer-Novelli e Cintron-Molero (1986).

Figura 10. Localização dos pontos amostrais na Baía de Vitória, onde foram realizadas as coletas de *L. angulifera* para as análises de intersex.



Fonte: Adaptado de IDAF (2010), Landsat 7, composição: R4C3B2 para a imagem de 2003.

Figura 11. Representação de uma parcela contendo 30 indivíduos de mangue.



Fonte: Elaboração própria.

3.2 METODOLOGIA

Nas 16 parcelas foram coletados cerca de 30 indivíduos em média de *L. angulifera* em cada, totalizando 352 indivíduos. Todos os exemplares mediam acima de 12 mm e foram considerados sexualmente maduros. O N amostral e a maturidade sexual foram selecionados de acordo com a metodologia proposta por Oehlmann et al. (1998) e De Wolf et al. (2001).

Os animais foram transportados para o Laboratório de Malacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, mantidos em aquários contendo água do mar até serem anestesiados (Figura 12) em solução de Cloreto de Magnésio $MgCl_2$ 4%, em água do mar e água destilada 1:1. As medidas de comprimento da concha (mm) foram tomadas com o auxílio de um paquímetro de precisão, em seguida os exemplares foram desconchados com o auxílio de uma morsa (Figura 13), para uma melhor visualização das partes moles, e analisados sob estereomicroscopia.

Figura 12. Exemplos de *L. angulifera* imersos em solução de anestésico.



Fonte: Arquivo próprio.

Figura 13. Processo de quebra das conchas, com o auxílio de uma morsa, para uma melhor observação das partes moles.



Fonte: Arquivo próprio.

A razão sexual (M:F) foi determinada de acordo com Birchenough et al. (2002), valores menores que 1 indicam um desvio na razão sexual para fêmeas e valores maiores que 1, desvio para machos. A percentagem de intersex foi calculada pela proporção de fêmeas com características masculinas e o índice de intersex (ISI) foi determinado conforme Bauer et al. (1995, 1997) considerando os cinco estágios propostos por esses autores.

3.3 ANÁLISE DE INTERSEX

Para este estudo, foi utilizada a metodologia proposta por Bauer et al. (1995), adotando os cinco estágios de distúrbios fenotípicos causados pela síndrome para os valores de ISI.

3.4 ANÁLISE DE DADOS

Para comparar valores de comprimento de concha e estágio de intersex entre os pontos de coleta, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk. *A posteriori* realizou-se uma análise multivariada de dados (GLM). Correlações entre percentual de intersex e média de ISI foram testadas utilizando o teste de Spearman.

Para comparar os valores de comprimento da concha entre os pontos, sexo e as parcelas foi realizada uma análise de variância (ANOVA trifatorial). *A posteriori* utilizou-se o teste de Tukey.

Para as análises estatísticas, foram utilizados os softwares R i386 3.0.1 e BioStat 5.0. Os gráficos foram elaborados utilizando o Microsoft Excel 2010, R 3.0.1, e BioStat 5.0.

3.5 ESCOLHA DA ESPÉCIE

Neogastrópodes são reconhecidamente mais sensíveis ao TBT que Mesogastrópodes (VISHWAKIRAN et al., 2006), mas algumas espécies de mesogastrópodes, tais como *Cymatium parthenopeum* podem ser usadas como bioindicadores para COE's, principalmente em locais onde altos níveis de contaminação estão presentes (COSTA et al., 2008). Espécies da família Littorinidae

são mais tolerantes a altos níveis de contaminação por TBT (OEHLMANN et al., 2008).

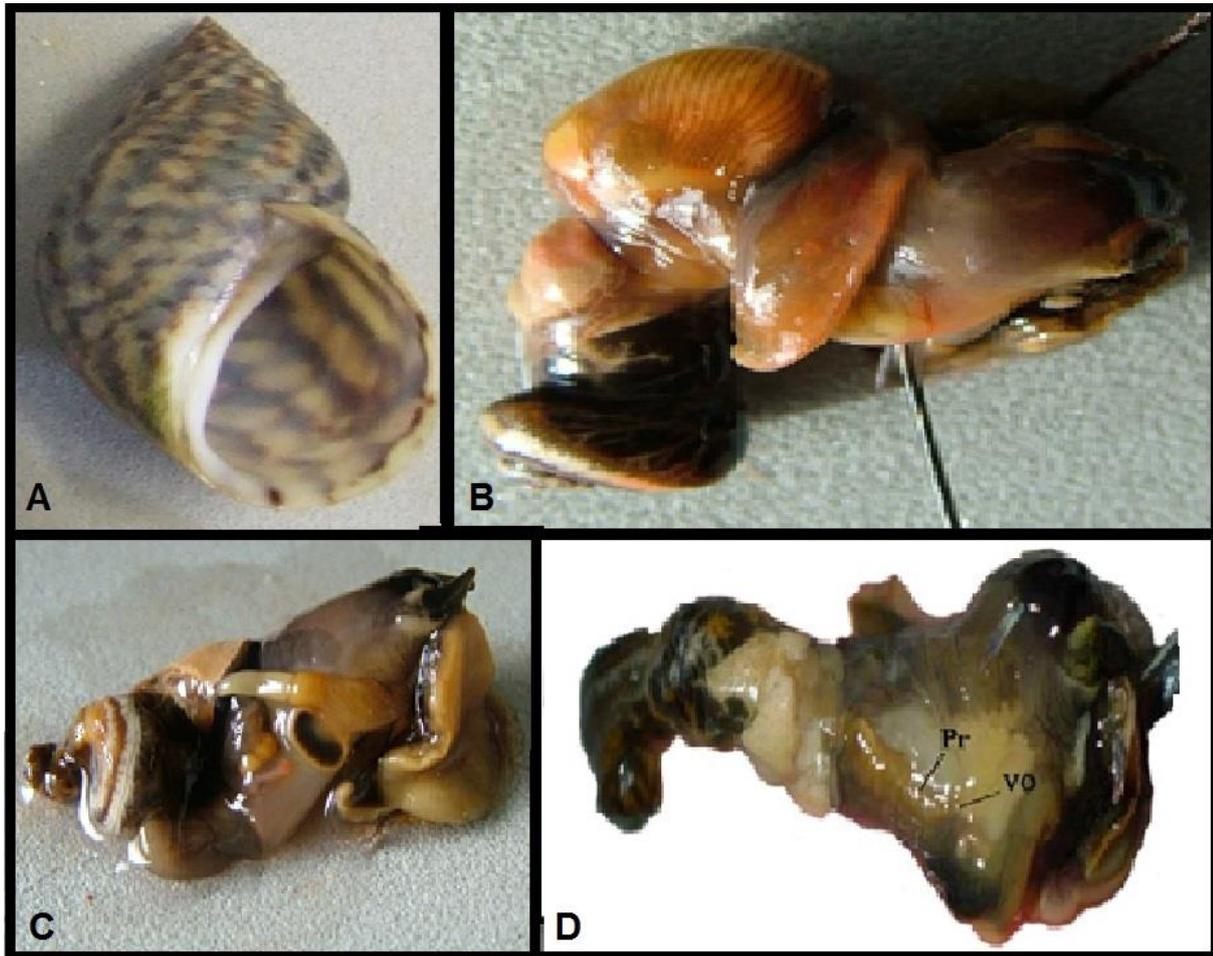
L. angulifera (Figura 15a) é um Littorinidae tropical, encontrado quase exclusivamente no manguezal (COSTA, 2012). Tem ocorrência no Oeste da África, Flórida, Texas, Oeste da Índia, Venezuela, do Suriname até a costa do Brasil (do Ceará até Santa Catarina; e em ilhas oceânicas, Trindade e Abrolhos) (RIOS, 1994; THOMÉ, 2010). Vive sobre raízes, troncos e folhas de árvores em mangues, nas zonas de maré alta (THOMÉ, 2010). Podem ser encontrados também em substrato artificial ou em costões rochosos, pois se alimentam de algas e epífitas (COSTA, 2012).

As fêmeas possuem um ovário de cor amarelo-creme está envolvido pela glândula digestiva marrom, e se localiza no ápice da concha (COSTA, 2012). Um oviduto estreito, que quando contém ovos, apresenta coloração rosa e encontra-se em baixo da massa visceral, no lado direito (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). A região posterior do oviduto se abre no oviduto palial, que é branco opaco, e está localizado no lado direito do manto, composto pela glândula do albúmen e a glândula da cápsula (COSTA, 2012). A glândula da cápsula se abre por meio da abertura genital (Figura 15b, 16) (COSTA, 2012).

Os machos (Figura 15c, 17, 18) possuem, na extremidade posterior da massa visceral, um complexo testículo-glândula digestiva no ápice da concha (COSTA, 2012). O testículo é de cor amarela enquanto a glândula digestiva tem cor marrom-esverdeada. Seus lobos são intercalados entre os lobos da glândula digestiva, e os dois são de difícil distinção (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). “A próstata está localizada no lado direito da cavidade do manto, paralela ao reto e sua região anterior se abre em um canal peniano ciliado, que segue na direção do pênis” (COSTA, 2012). O pênis está localizado no lado direito posterior do tentáculo cefálico, e possui uma glândula discoide que é usada para apoiar as fêmeas durante a cópula (Figura 15b) (RUPERT; FOX; BARNES, 2005; COSTA, 2012).

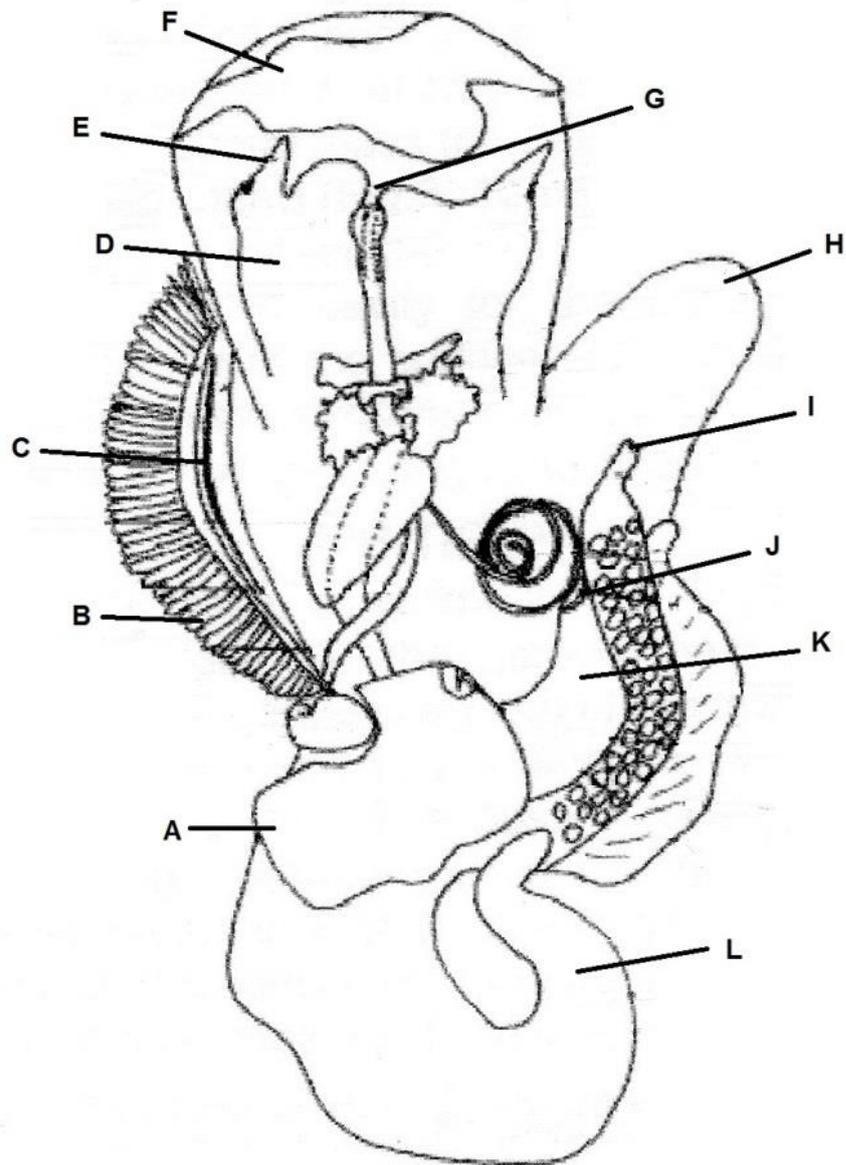
Fêmeas intersexadas apresentam uma gradual substituição da glândula da cápsula pela próstata (COSTA, 2012). Pode-se observar essa alteração morfológica na figura 15d, onde a fêmea se encontra no ISI 3.

Figura 15. Exemplos de *L. angulifera*. a) Concha, b) Fêmea normal, c) Macho e d) Fêmea intersexuada ISI 3. GC: Glândula da Cápsula, VO: Abertura Genital, Pr: Próstata.



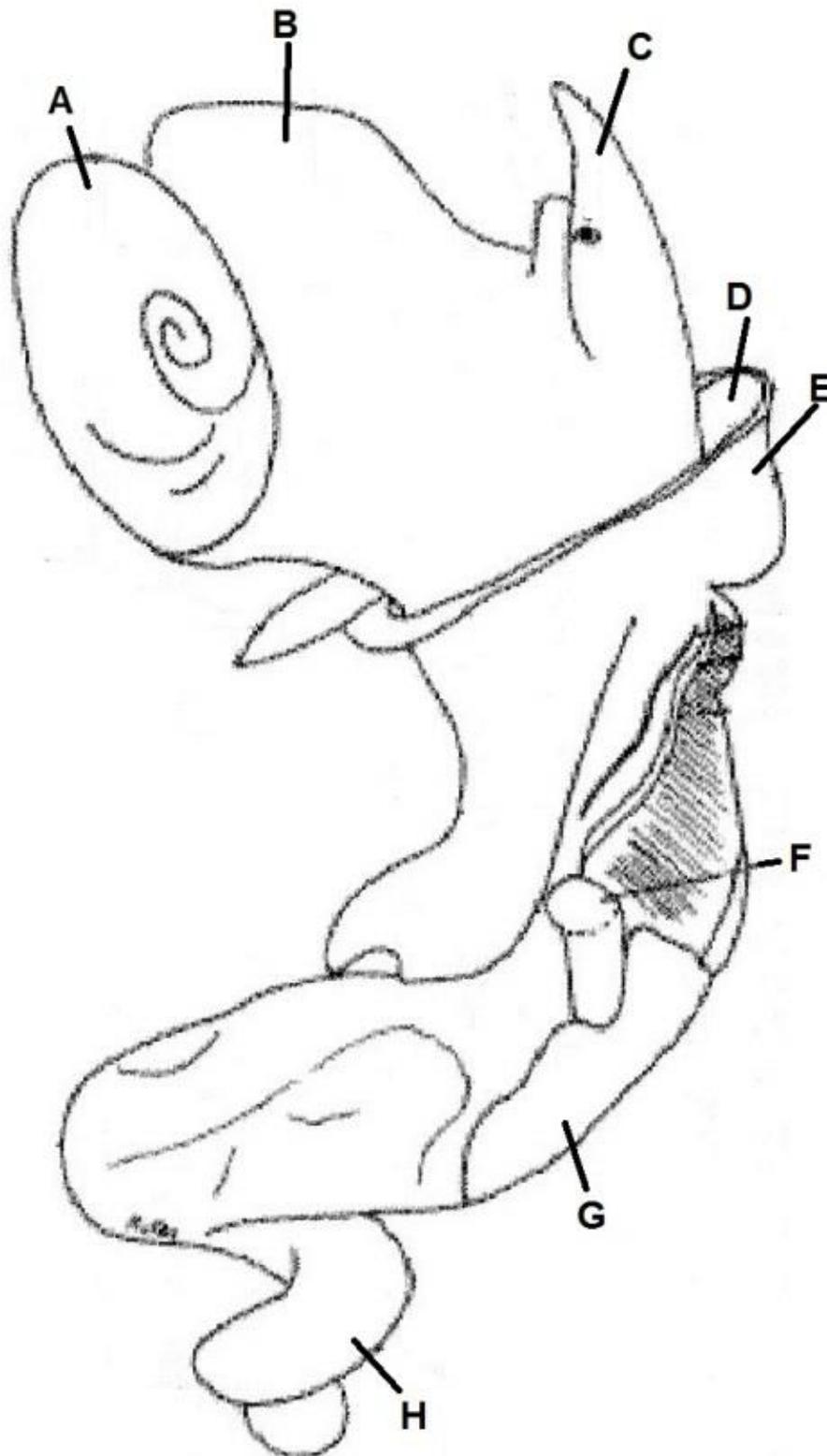
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 16. Vista dorsal de uma fêmea de *Littorina littorea* com a cavidade do manto aberta. O manto foi aberto por uma incisão entre a brânquia e a hipobrânquia. a) Rim, b) Brânquia, c) osfrádio, d) Cabeça, e) Tentáculo cefálico, f) Pé, g) Abertura bucal, h) Manto, i) Ânus, j) Gonóporo, k) Glândula da cápsula, l) Glândula digestiva e ovário.

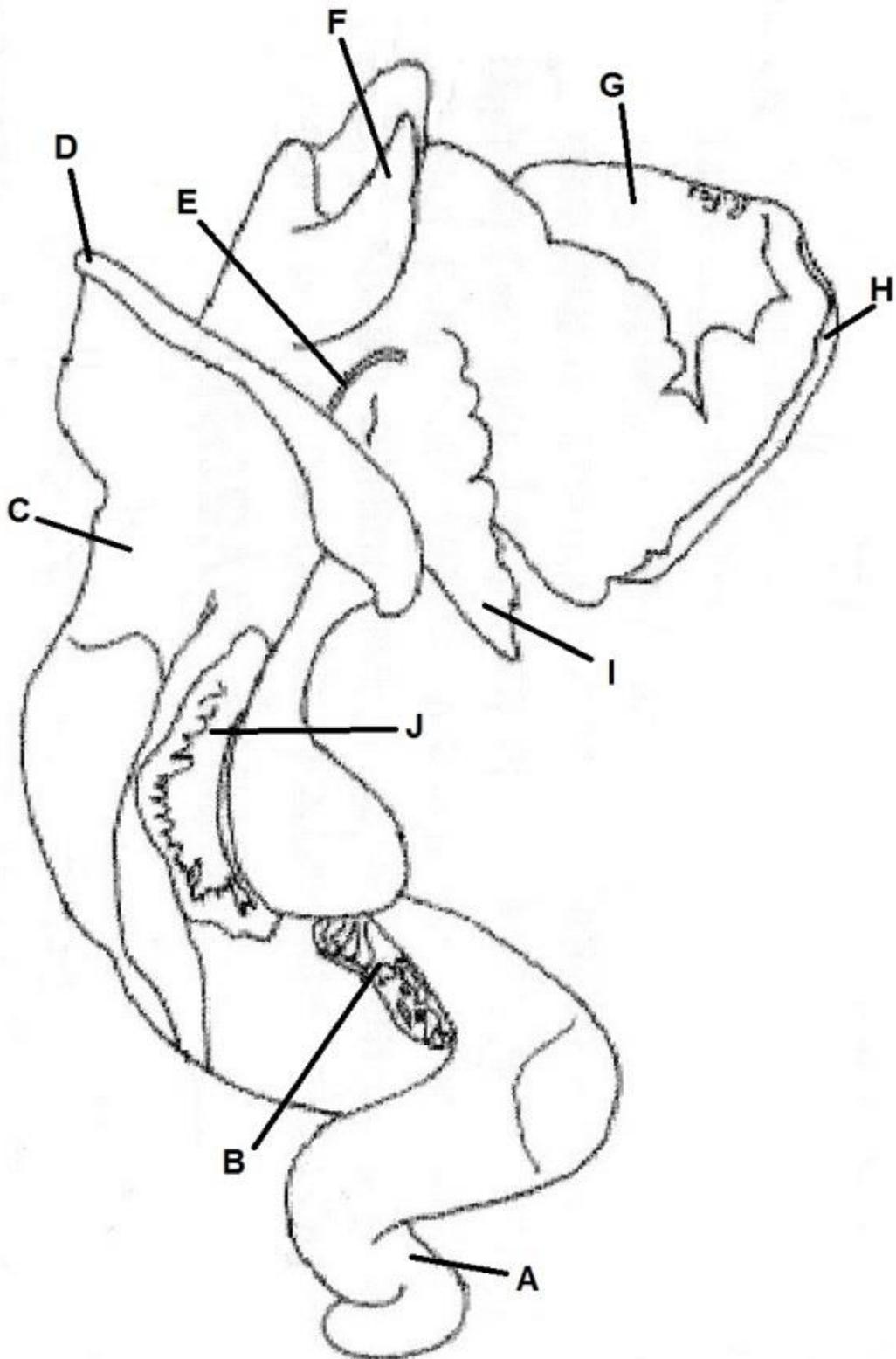


Fonte: RUPERT; FOX; BARNES, 2005.

Figura 17. Vista do lado esquerdo de um macho de *L. littorea* desconchado, com estruturas internas intactas. a) Opérculo, b) Pé, c) Tentáculo Cefálico, d) Cavidade do manto, e) Manto, f) Brânquias, g) Rim, h) Complexo testículo-glândula digestiva.



igura 18. Vista do lado direito de um macho de *L. littorea* com a concha removida. A) Complexo testículo-glândula digestiva, B) Vesícula seminal, C) Manto, D) Cavity do manto, E) Ducto espermático, F) Tentáculo cefálico, G) Pé, H) Pênis, J) Glândula da próstata.



Fonte: RUPERT; FOX; BARNES, 2005.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de intersex e dados biométricos podem ser observados na Tabela 01. Nesse estudo foram coletados um total de 352 exemplares de *L. angulifera*. Desse total, 36,58% das fêmeas coletadas nos 12 pontos amostrais estavam intersexadas. Nos pontos 1B, 2B, 5B e 5B não foram encontrados indivíduos desta espécie dentro das parcelas.

Tabela 01. Resultados obtidos para *L. angulifera* para os pontos amostrais. Razão sexual = N° Macho/N° Fêmea; ISI: índice de intersex.

Locais	Nº fêmeas	Nº machos	Razão Sexual	% Intersex	Média ISI	Comp. da Concha(mm)
1F	16	16	1	68,75	1,7	27,03 ± 3,12
2F	17	15	0,88	41,17	0,9	29,4 ± 3,04
3F	13	18	1,38	69,23	2	26,77 ± 2,57
4F	10	21	2,1	0	-	29,52 ± 2,51
5F	15	16	1,06	0	-	21,84 ± 4,20
6F	20	11	0,55	5	0,1	29,17 ± 2,50
7F	13	18	1,38	84,61	1,9	26,2 ± 2,36
8F	16	14	0,87	31,25	0,7	25,38 ± 3,70
1B	0	0	-	-	-	-
2B	0	0	-	-	-	-
3B	9	20	2,22	77,77	2,1	26,75 ± 2,69
4B	0	0	-	-	-	-
5B	0	0	-	-	-	-
6B	17	16	0,94	23,52	0,5	23,82 ± 2,60
7B	6	4	0,66	0	-	22,5 ± 2,48
8B	12	18	1,5	41,66	0,9	22,81 ± 1,75

Fonte: Elaboração própria.

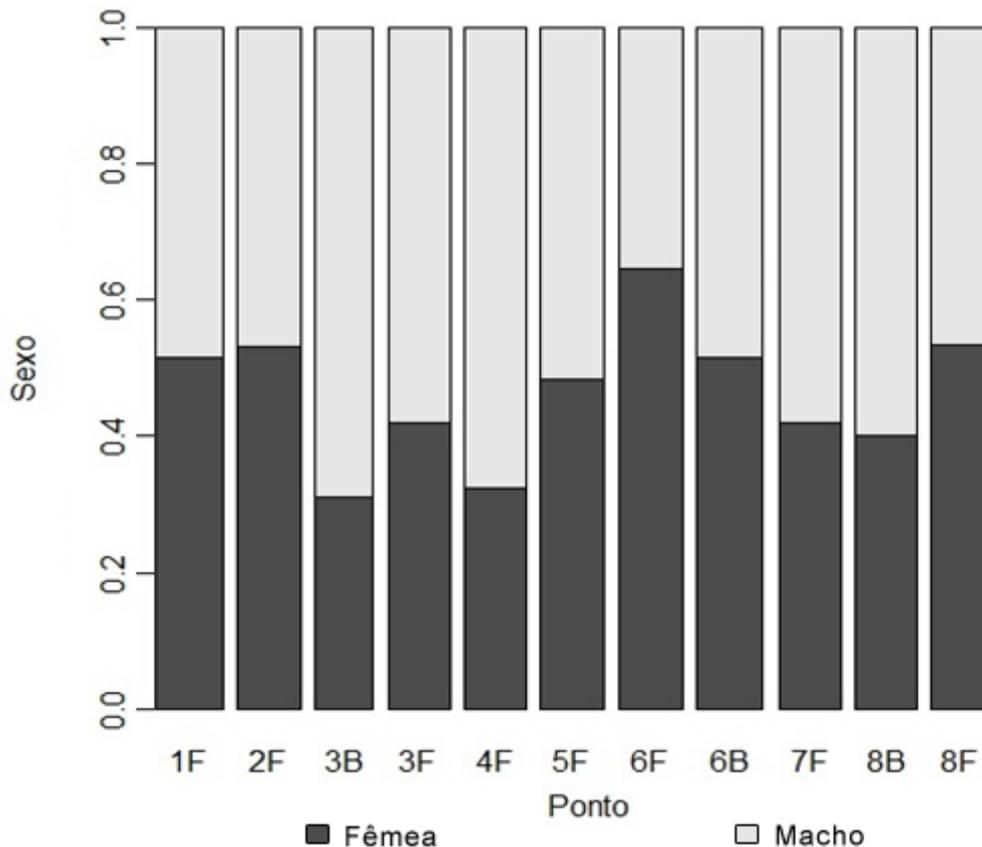
4.1 DISTRIBUIÇÃO DA RAZÃO SEXUAL NAS ÁREAS AMOSTRAIS

Os pontos amostrais com maior e menor número de fêmeas foram o 6F e 7B, apresentando 20 e 6 indivíduos respectivamente. Os pontos com maior e menor número de machos foram 4F e 7B, com 21 e 4 indivíduos respectivamente (Tabela 01). A razão sexual para os pontos 2F, 6F, 6B, 7F e 7B foram menores que 1, indicando um desvio para fêmeas. Nos demais pontos observa-se uma razão sexual desviada para machos, sendo que o ponto 3B apresentou o maior número de machos em relação às fêmeas (2,22) (Tabela 01).

O maior valor de percentagem de fêmeas em relação a machos pode ser encontrados no ponto 6F, com 64,5%. A percentagem de fêmeas nos pontos 1F, 2F,

6B e 8F foi de aproximadamente 50%. Os pontos 3B, 3F, 4F, 5F, 7F e 8B apresentaram menos de 50% de fêmeas em relação a machos (Gráfico 01).

Gráfico 01. Razão sexual de *L. angulifera* obtidas nos pontos amostrais.



Fonte: Elaboração própria.

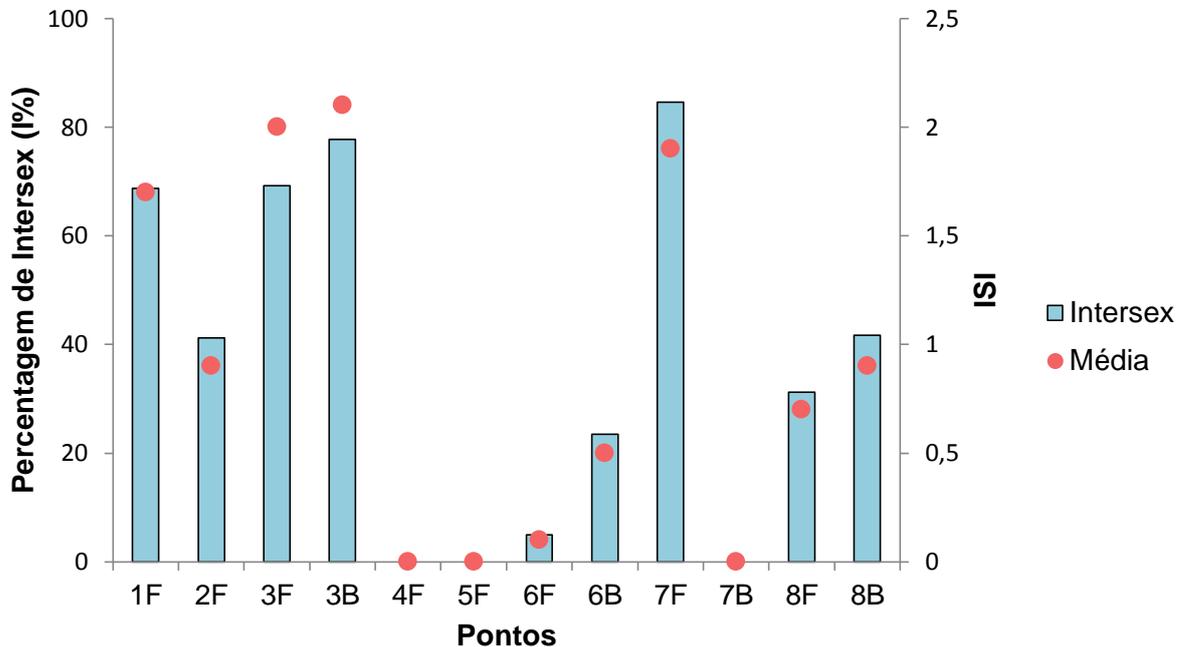
4.2 ÍNDICES DE INTERSEX

Houve diferença significativa dos valores de ISI entre os pontos ($p = >0,005$). Os maiores valores para a percentagem de intersex foram encontrados nas franjas, sendo os pontos 3F (69,23%) e 7F (84,61%) os de maior percentagem. Entretanto, o ponto 3B, apresentou a segunda maior percentagem de intersex, 77,77%. Esse resultado se contrapõe aos resultados encontrados para a bacia, cujos indivíduos apresentaram taxas mais baixas de intersex comparadas à franja.

Na maioria dos pontos amostrais, as médias de ISI foram proporcionais aos valores de percentagem de intersex (Gráfico 02). Já nas parcelas do ponto 3, as médias de ISI foram superiores aos demais pontos (2 para o ponto 3F e 2,1 para o ponto 3B), porém, não foram as com maior percentagem de intersex (69,23% para o ponto 3F e

77,77% para o ponto 3B). E o ponto 7F apresentou um resultado inverso, com maior percentagem e média de ISI relativamente baixa (1,9). Os pontos 4F, 5F e 7B não apresentaram indivíduos afetados pela síndrome.

Gráfico 02. Percentagem de Intersex (I%) e média de ISI em relação aos pontos amostrais.

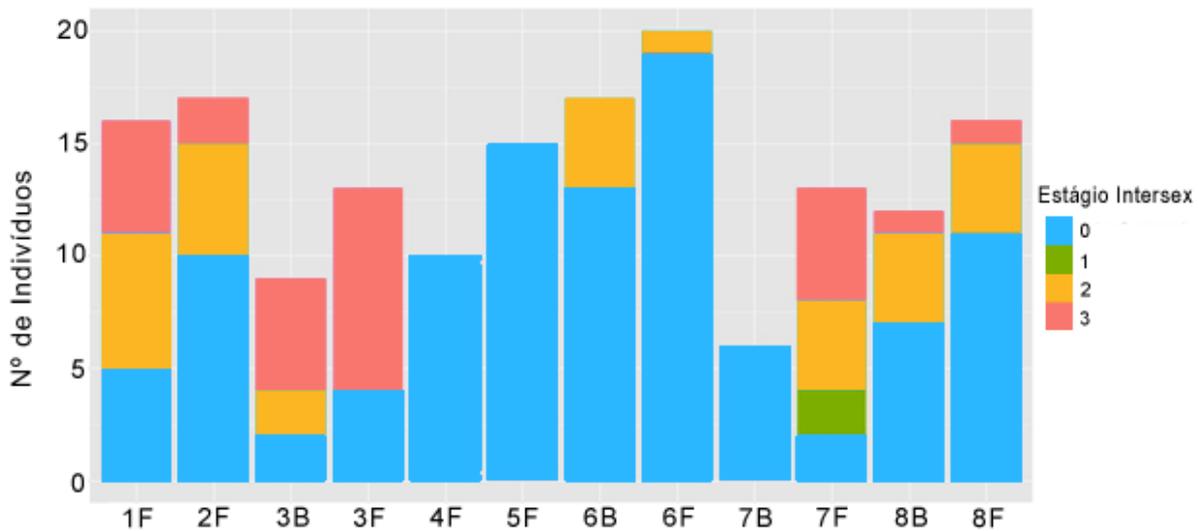


Fonte: Elaboração própria.

Os estágios de ISI variaram de 0 a 3. Os pontos 1F, 3F e 3B apresentaram os maiores valores desses índices.

No ponto 3F, todas as fêmeas intersexadas se encontravam no estágio 3 da síndrome (Gráfico 03). Os pontos 1F, 2F, 3B, 8B e 8F apresentaram os estágios 2 e 3 de contaminação. A única ocorrência do estágio 1 foi no ponto 7F, demonstrando um gradiente evolutivo de contaminação, por apresentar todos os níveis de contaminação encontrados. Os pontos de bacia, com exceção do ponto 3, apresentaram valores baixos para o nível 3 de contaminação, havendo predominância do nível 2 ou não apresentaram indivíduos contaminados.

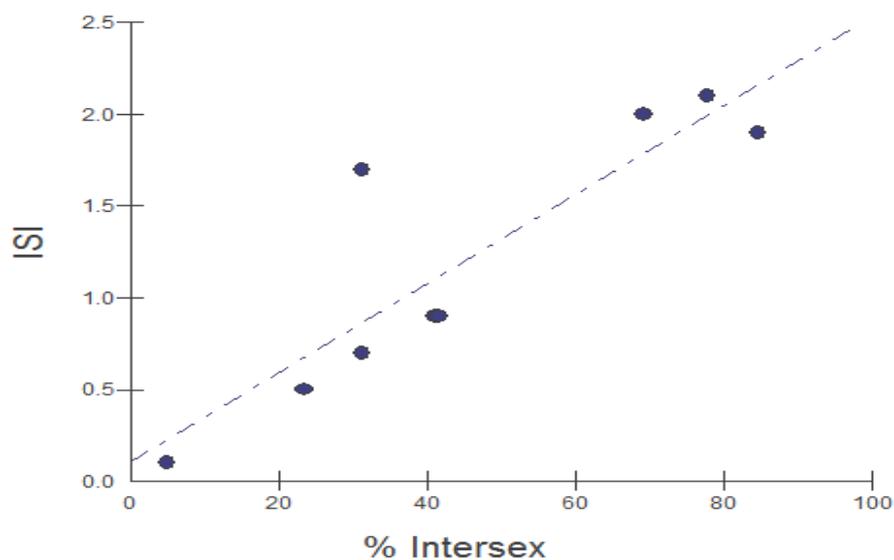
Gráfico 03. Valores de ISI encontrados nos pontos amostrais.



Fonte: Elaboração própria.

Foi obtida uma correlação positiva entre os valores médios de ISI e % de intersex (Gráfico 04). Desse modo, os resultados indicam que ambos os índices apresentam sensibilidade necessária para a população.

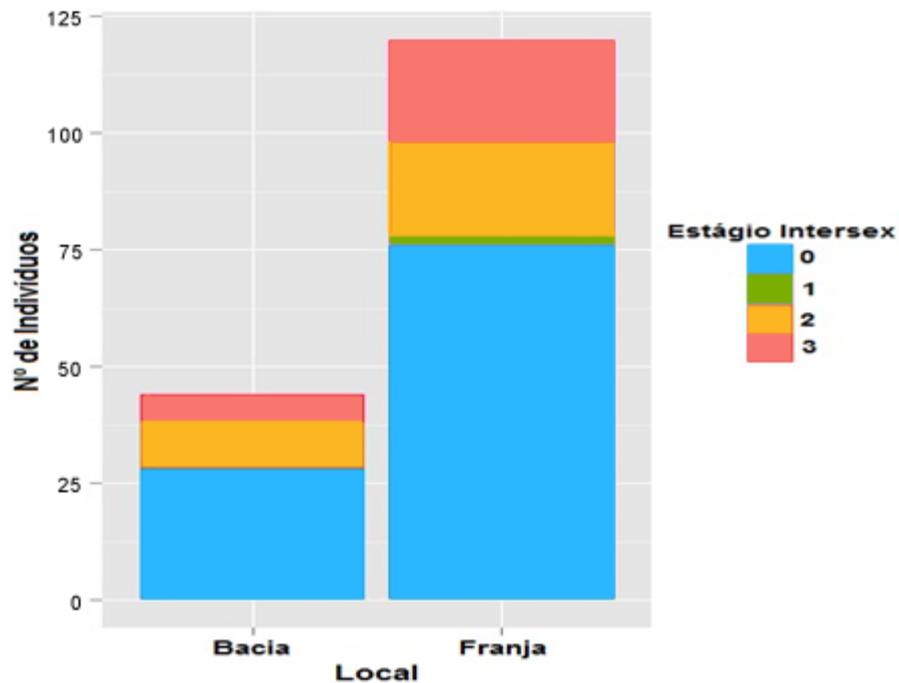
Gráfico 04. Correlação entre os valores de intersex (I%) e média de ISI. Resultados do Teste de Spearman: $r = 0,87$; $p < 0,05$.



Fonte: Elaboração própria.

Em relação à franja e bacia, devido a maior quantidade de indivíduos coletados, ouve uma maior representatividade de fêmeas intersexadas na franja (Gráfico 05).

Gráfico 05. Proporção de indivíduos em relação a franja e bacia.

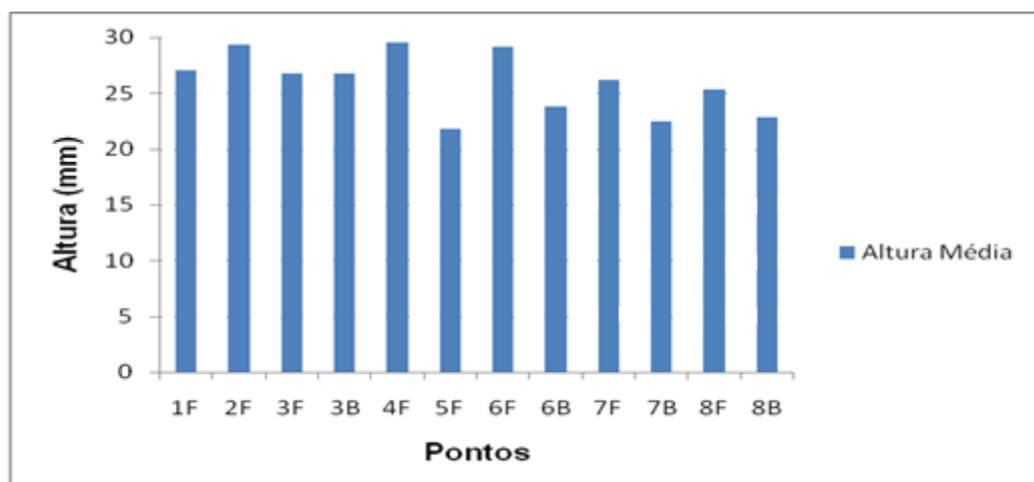


Fonte: Elaboração própria.

4.3 COMPRIMENTO DAS CONCHAS

Em relação ao comprimento das conchas, houve diferença significativa entre os pontos ($p = > 0,005$). Os indivíduos coletados nos pontos 2F, 4F e 6F apresentaram maiores valores quando comparados aos valores registrados nos demais pontos (Gráfico 06).

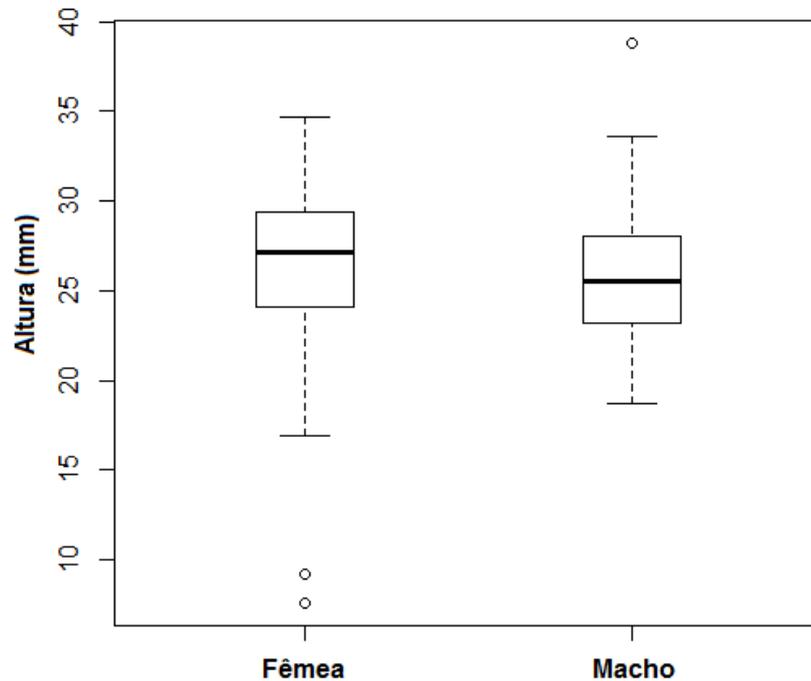
Gráfico 06. Valores médios de comprimento de concha encontrados nos pontos amostrais.



Fonte: Elaboração própria.

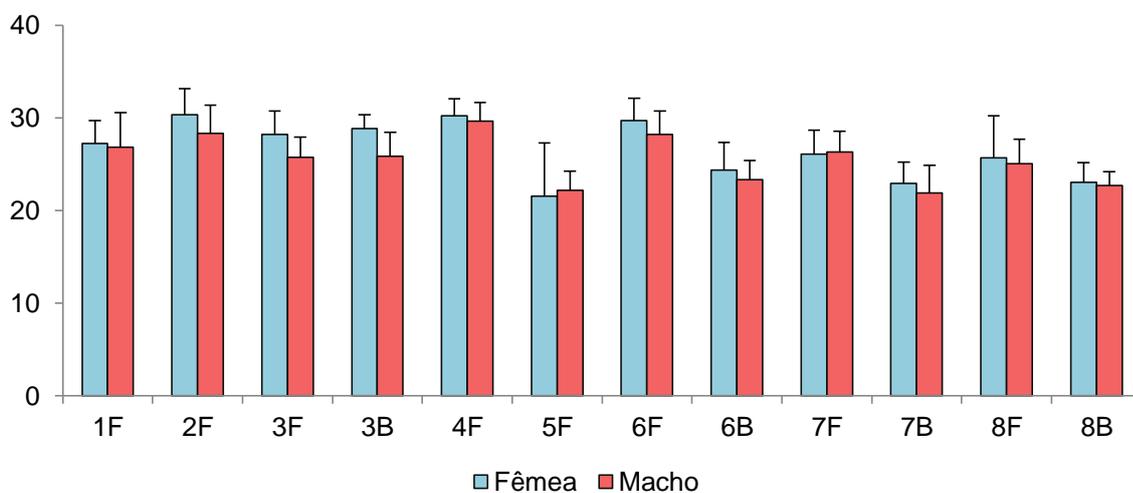
Em relação às diferenças encontradas nos comprimentos de conchas de machos e fêmeas, pode-se observar que as fêmeas são significativamente maiores que os machos (Gráfico 07, Gráfico 08, Tabela 02).

Gráfico 07. Distribuição dos valores de comprimento de conchas de *L. angulifera* em relação ao sexo.



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 08. Distribuição dos valores de comprimento de conchas de *L. angulifera* para cada ponto amostral.



Fonte: Elaboração própria.

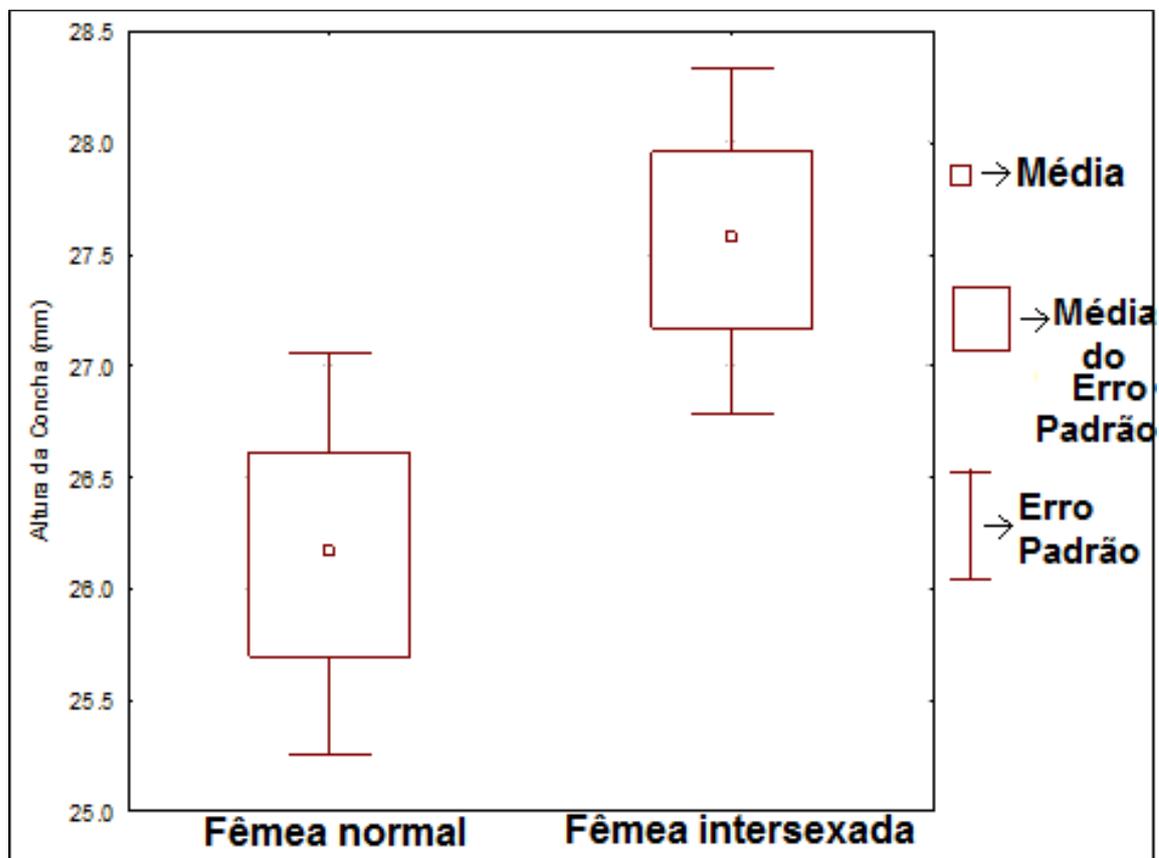
Tabela 02. Resultados da ANOVA trifatorial utilizando os valores de comprimentos de concha entre os pontos de amostragens e o sexo. F: valor do teste; p: probabilidade associada ao valor do teste; $\alpha = 0,05$.

Variável	Fonte de Variação	Graus de Liberdade	F	P	Tukey
Comprimento da concha	Pontos	7	25,64	>0,001	5<8=7=6=1<2,3,4
	Sexo	1	9,13	0,003	Fêmea > Macho
	Parcela	1	47,8	>0,001	-

Fonte: Elaboração própria.

Os comprimentos de conchas de fêmeas intersexadas foram maiores que os das fêmeas normais, sendo os valores de média e desvio padrão $27,56 \pm 3,06$ e $26,16 \pm 4,67$ respectivos (Gráfico 09).

Gráfico 09. Média e desvio padrão para os valores de comprimento de concha de fêmeas normais e intersexadas.



Fonte: Elaboração própria.

Não foram encontrados indivíduos em quatro parcelas, sendo três na bacia e uma na franja, apesar da presença de árvores de *Laguncularia racemosa* e *Rizophora mangle*. Os Littorinidae, em geral tem preferência por substratos de folha e casca de árvores (REID, 1986), o que pode influenciar na presença ou ausência do indivíduo, uma vez que não há ocorrência de folhas em níveis mais baixos de bosque de *Rizophora*. Esse resultado não indica ausência do contaminante, uma vez que o mesmo não pode ser medido devido a ausência do bioindicador.

A razão sexual encontrada nos pontos 2F, 6F, 6B, 7B e 8F foi menor que 1,0, indicando um desvio para fêmeas de acordo com Birchenough et al. (2002). A razão sexual encontrada para *L. littorea* (1:1) (de WOLF et al., 2004) foi observada nesse estudo para *L. angulifera* no ponto 1F.

Os maiores valores de percentagem de intersex foram encontrados próximos a abertura do canal da passagem (Parcelas 2F, 3B e 3F), no meio desse mesmo canal (1F); ao Bairro Santo Antônio (7F) e no canal do porto, próximos ao Morro do Penedo (8F e 8B). Possivelmente as embarcações presentes nessas áreas continuam usando tintas anti-incrustantes à base de TBT, justificando esses resultados. Resultados semelhantes foram encontrados por Minchin et al. (1996), De Wolf (2001), De Wolf (2004), Broeck et al. (2007) e Broeck et al. (2009) os quais observaram um elevado *input* de TBT em áreas portuárias e urbanizadas.

Os baixos valores de percentagem de intersex encontrados nos pontos 4F, 5F, 6F, 6B e 7B podem ser explicados pela baixa atividade de transporte nesses locais. A hidrodinâmica do local também influencia nesses resultados. O canal com maior influência é o Rio Santa Maria, com vazão de 15,7 m³/s (VERONEZ JUNIOR et al., 2009), enquanto os outros canais contribuem com menos de 3 m³/s. Como o TBT se acumula rapidamente no sedimento (LANGSTON; POPE, 1995), a baixa ressurgência no local também explica os baixos valores de intersex encontrados.

Cabe ressaltar que quase todas as fêmeas coletadas, que apresentavam a síndrome, estavam estéreis, uma vez que, segundo Bauer et al. (1995), a partir do estágio 2, a má formação morfológica do oviduto inibe a formação da cápsula e a cópula.

No estágio 3 (encontrado nos pontos 1F, 2F, 3F, 3B, 7F, 8F e 8B) ocorre uma substituição total do oviduto palial por uma glândula prostática, impedindo a

alimentação extra-embriônica dos ovos e a formação das cápsulas de ovos, levando à falência reprodutiva (BAUER et al., 1997; COSTA, 2012). A ocorrência desses estágios indica populações em risco de extinção, mesmo que localmente.

Comparando com a literatura, os maiores valores de ISI encontrados no presente estudo (ISI 2,1) são semelhantes aos encontrados por Bauer et al. (1997) (ISI > 3,0) para *L. littorea*, menores que os encontrados por Costa em 2012 (ISI 3,0) para *L. angulifera*, próximo a áreas portuárias, e Van den Broeck (2009) (ISI 3,52) (*L. littorea*) e maiores que os encontrados para a mesma espécie coletados em Portugal (ISI 0,5) (BARROSO; MAREIRA; GIBBS, 2000), Irlanda (ISI 1,60) (MINCHIN et al., 1997), Holanda (ISI 1,40) (BROECK et al., 2007) e na Noruega (ISI 1,92) (BROECK et al., 2009) em áreas portuárias.

Assim como o resultado encontrado por Costa (2012) para a baía de Vitória, os valores de intersex foram bastante variáveis, sendo encontradas populações saudáveis (pontos 4F, 5F e 7B). A distância das principais fontes de TBT pode ter contribuído para esses resultados, entretanto, a ocorrência de alguns ancoradouros na região podem justificar a ocorrência de intersex em alguns desses pontos.

A correlação positiva entre os valores de ISI e I% encontrados neste estudo indicam que ambos os índices apresentam sensibilidade necessária para avaliar o nível de contaminação por TBT e suas consequências para a população. Entretanto, de acordo com Bauer et al. (1997), o ISI é um índice mais adequado para avaliar a capacidade reprodutiva de uma população do que a percentagem de intersex (I%), uma vez que o ISI permite avaliar a percentagem de esterilidade.

Os indivíduos coletados nos pontos 2F e 4F, localizados em áreas de manguezal mais preservadas, apresentam maiores valores de comprimento de concha quando comparados com os valores registrados nos demais pontos. Possivelmente, a melhor condição desse ecossistema, representado por árvores mais desenvolvidas, com maior disponibilidade de substrato e de alimento para *L. angulifera*, pode ter contribuído para esse resultado, uma vez que nos pontos onde o bosque de manguezal não era tão desenvolvido, os indivíduos foram menores (Tabela 4.1).

Van den Broeck et al. (2009) verificou que indivíduos de áreas mais severamente afetadas pela contaminação por TBT tinham conchas maiores e mais pesadas, quando comparados com indivíduos de ambientes saudáveis. É possível confirmar

isso nesse estudo, uma vez que as fêmeas intersexadas apresentavam comprimentos de concha maiores que as fêmeas normais.

CONCLUSÕES

Espécies da família Littorinidae são mais tolerantes a altos níveis de contaminação por TBT (OEHLMANN et al., 1998). Entretanto, os resultados obtidos nesse estudo indicam que *L. angulifera* também é um sensível bioindicador e pode ser usado como espécie sentinela para esses compostos, especialmente em regiões onde outros Neogastropodes não estão presentes, como os manguezais, ou que apresentam níveis consideravelmente mais altos de TBT. Além disso, por ser uma espécie amplamente distribuída e de fácil coleta, torna-se uma excelente escolha para monitorar a contaminação por TBT em áreas de manguezal.

Os resultados obtidos, com altos níveis de intersex, indicam que a baía de Vitória e os municípios de Serra, Vila Velha e Cariacica estão sendo afetados negativamente pela presença de COE's.

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. **Tributylti (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.
- ALMEIDA, L. G., SILVA, M. R. L. F., VALE, C. C. **Análise multitemporal da baía de Vitória (ES) utilizando sensoriamento remoto.** In: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2007, Florianópolis. Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, INPE, 2007, p. 4557-4564.
- ALONGI, D. M. **Inter-estuary variation and intertidal zonation of free-living nematode communities in tropical mangrove systems.** Marine Ecology. v. 40, p. 103-114, 1987.
- ALONGI, D. M. **Present state and future of the world's mangrove forests.** Foundation for Environmental Conservation. v. 28, n. 3, p. 331-349, 2002.
- ALVES, A. **Os Argonautas do Mangue.** Campinas: Unicamp, 2004.
- ALZIEU, C. **TBT Detrimental Effects in Oyster Culture in France - Evolution Since Antifouling Paint Regulation.** Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference. v. 4, p. 1130-1134, 1986.
- ANTIZAR-LADISLAO, B. **Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment.** A review. Environmental International. v. 34, p. 292-308, 2008.
- ARAÚJO, M. L. R.; ROCHA-BARREIRA, C. A. **Distribuição espacial de *Anomalocardia brasiliana* (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, 2004.
- ASHTON, E.C.; MACINTOSH, D.J.; HOGARTH, P.J. **A baseline study of the diversity and community ecology of crab and molluscan macrofauna in the Sematan mangrove forest, Sarawak, Malaysia.** Journal of Tropical Ecology. v. 19, p. 127-142, 2003.
- AXIAK, V.; VELLA, A.J.; AGIUS, D.; BONNICI, P.; CASSAR, G.; CASSONE, R.; CHIRCOP, P.; MICALLER, D.; MINTOFF, B.; SAMMUT, M. **Evaluation of environmental levels and biological impact of TBT in Malta (central Mediterranean).** The Science of Total Environmental. 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.

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

BALLS, 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, p. 227-237, 1987.

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

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, J.; KALBFUS, W. **The use of *Littorina littorea* for a tributyltin (TBT) effect monitoring – results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments.** Environmental Pollution. v. 96, p. 299-309, 1997.

BERRY, A. J. **Some factors affecting the distribution of *Littorina saxatilis* (Olivi).** Journal of Animal Ecology. v. 30, p. 27-45, 1961.

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.

BIRCHENOUGH, A. C., BARNES, N., EVANS, S. M., HINZ, H., KRONKE, I., MOSS, C. **A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods.** Marine Pollution Bulletin. v. 44, p. 534-543, 2002.

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.

BOUCHET, P., ROCROI, J.-P., (Eds.). **A nomenclator and classification of gastropod family-group names.** With classification by Frýda, J., Hausdorf, J.B., Ponder, W., Valdes, A., Warén, A., Malacologia 47, pp. 1–397, 2005.

BRASIL, Marinha do. **Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas antiincrustantes em embarcações.** 2007.

BRUSCA, R. C., BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2007.

BRYAN, G. W., GIBBS, P. E. Impact of low concentration of tributyltin TBT on marine organisms: a review. In: NEWMAN, M. C., McINTOSH, A. W., (EDs), **Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications**. Lewis, Ann. Arbour. p. 323-361, 1991.

CANNICCI, S.; BURROWS, D.; FRATINI, S.; SMITH, T.J.; OFFENBERG, J.; DAHDOUH-GUEBAS, F. **Faunal impact on vegetation structure and ecosystem function in mangrove forests: A review**. Aquatic Botany. v. 89, p: 186-200, 2008.

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.

CASEY, J. D., DE GRAVE, S., BURNELL, G. M. **Intersex and iin Cork Harbour: results of a medium-term monitoring programate**. Hydrobiologia. v. 378, p. 193-197, 1998.

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. 96-112, 2007.

CHAMP, M.A., PUGH, W.L. **Tributyltin antifouling paints: introduction and overview**. Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference, v. 4, 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. 177-185, 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 (*Neophocaena asiaeorientalis*) from Korean coast: Tracking the effectiveness of TBT regulation over time**. Marine Pollution Bulletin. v. 66, 2013.

CINTRON-MOLERO, G., SHAEFFER-NOVELLI, Y. **Introduction a ecologia del manglar**. Montevideo/UNESCO, 109 p., 1983.

CITRÓN, G.; NOVALLI Y. Ecology and Management of New World Mangroves. In: SEELIGER, U. (Org.). **Coastal plant communities of Latin America**. San Diego: Academic,. p. 233-258. 1992

COLGAN, D.J., HUTCHINGS, P.A., BRAUNE, M. **A multigene framework for polychaete phylogenetic studies**. Org. Divers. Evol. v. 6, p. 220–235, 2006. Contam. v. 23, p. 749–56, 2006.

- COOK, L. M. **The neutral assumption and maintenance of colour morph frequency in mangrove snails.** *Heredity*. v. 69, p. 184-189, 1992.
- COOK, L. M., CURREY, J. D., SARSAM, V. H. **Differences in morphology in relation to microhabitat in littorinid species from a mangrove in Papua New Guinea (Mollusca: Gastropoda).** *Journal of Zoology*. v. 206, p. 297-310, 1985.
- COOK, L. M., GARBETT, S. D. **Selection in the polymorphic mangrove snail *Littoraria pallescens*.** In: GRAHAME, J., MILL, P. J., REID, D. G. (EDs) *Proceedings of the third international symposium on Littorinid Biology.* The Malacological Society of London. p. 247-253, 1992.
- COSTA, M. B. Análise ultraestrutural de pênis e vaso deferente em machos e fêmeas imposexadas de Neogastrópodes e Mesogastrópode coletados em áreas contaminadas por organoestânicos. In: _____. **Avaliação da contaminação por compostos organoestânicos (COE's) no litoral do Espírito Santo por meio de indicadores biológicos, imposex e intersex: uma análise espacial e temporal.** p. 153-183. 2012.
- COSTA, M. B. *Littoraria angulifera* (Gastropoda, Prosobranchia, Mesogastropode): um novo bioindicador para compostos orgânicos de estanho em áreas de manguezal? In: _____. **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.** Vitória. p. 184-208, 2012.
- COX, L. R. **Thoughts on the classification of the Gastropoda.** *Proc. Malac. Soc.* v. 33, p. 239–261, 1960.
- DAHLLÖF, I.; AGRENIUS, S.; BLANCK, H.; MAGNUSSON, K.; MOLANDER, S. **The effect of TBT on the structure of a marine sediment community – a boxcosm study.** *Marine Pollution Bulletin*. v. 42, p. 689-695, 2001.
- DALMASCHIO, R. G., TEIXEIRA, G. L. G., GARÇÃO, H. F. **Caracterização da distribuição sedimentar do canal de acesso aos portos do sistema estuarino da Baía de Vitória.** Associação Brasileira de Oceanografia. 2008.
- DAVIES, I. M., MINCHIN, A. **Quality assurance of imposex and intersex measurements in marine snails.** *J. Environ. Monit.* v.4, p. 788-790, 2002.
- DE WOLF, H., DE COEN, W., BACKELJAU, T., BLUST, R. **Intersex and sterility in the periwinkle *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along the Western Sheldt Estuary, The Netherlands.** *Marine Environmental Research*. v. 52, p. 249-255, 2001.
- DE WOLF, H.; HANDA, C.; BACKELJAU, T.; BLUST, R. **A baseline for survey of intersex in *Littorina littorea* along the Sheldt Stuary, The Netherlands.** *Marine Pollution Bulletin*. v. 48, p. 587-603, 2004.
- DERENZI, L. S. **Biografia de uma ilha.** Rio de Janeiro: Pongetti, 1965.

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.

ESPÍRITO SANTO (Estado). Instituto de Defesa e Agropecuária do Espírito Santo. In: _____. VITÓRIA – ES. Espírito Santo [s.d.]. Disponível em: <http://www.idaf.es.gov.br/images/Mapas/Vitoria.pdf>. Acesso em: 30 de maio de 2013.

EVANS, 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.

EYSINK, G. G. J.; BERNARDO, M. P. S. L.; SILVA, L. S.; BACELIERI, S.; SIQUEIRA, M. C.; UMMA, D.; VIGAR, N. D.; ACHKAR, S. M. **Replanteio de plântulas de LAGUNCULARIA RACEMOSA visando o seu uso em programas de recuperação de manguezais degradados.** In: **IV SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS BRASILEIROS. 1998. Águas de Lindóia.** Anais do IV simpósio de ecossistemas brasileiros. Anais.... Águas de Lindoia: ACIESP, v. 1, p. 48-52, 1998.

FAFANDEL, M.; MÜLLER, 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. 287, p. 239-252, 2003.

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. S. **compostos orgânicos de Estanho na Baía de Guanabara, RJ: sua distribuição no ambiente e possíveis impactos.** Rio de Janeiro, 2001.

FERNANDEZ, M.A. **Brazilian experience on TBT pollution: lessons for future studies.** Journal of Coastal Research. v. 39, 2004.

FERNANDEZ, M.A.; LIMAVERDE, A.M.; SCOFIELD, A.L.; WEGENER, A.L.R. **Preliminary evaluation of human health risks from ingestion of organotin contaminated seafood in Brazil.** Brazilian Journal of Oceanography. v.53, n. 1-2, São Paulo, 2006.

FERREIRA, R. D. **Os manguezais da baía de Vitória (ES): Um estudo de geografia física integrada.** 1989. Tese (Doutorado em Geografia) – Programa de pós-graduação em geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas (USP), São Paulo, 1989.

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.

GALLAGHER, S. B., REID, G. K. **Population dynamics and zonation of the periwinkle *Littorina angulifera* of the Tampa Bay, Florida, region.** The Nautilus. v. 94, p. 162-178, 1979.

GAMMON, M., TURNER, A., BROWN, M. **Accumulation of Cu and Zn in discarded antifouling paint particles by the marine gastropod, *Littorina littorea*.** Estuarine, Coastal and Shelf Science. v. 84, p. 447-452, 2009.

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.

HALLERS-TJABBES, C.C., KEMP, J.F., BOON, J.P. **Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: Relation to shipping traffic intensities.** Marine Pollution Bulletin. v. 28, p. 311–313. 1994.

HASZPRUNAR, G. **On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura (Mollusca).** J. Moll. Stud. v. 54, p. 367–441, 1988.

HORIGUSHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M.; MORITA, M. **Imposex 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.

JANSON, K. **Genetic and environmental effects on the growth rate of *Littorina saxatilis*.** Marine Biology. v. 69, p. 73-78, 1982a.

JANSON, K. **Phenotypic differentiation in *Littorina saxatilis* (Olivi) (Mollusca, Prosobranchia) in a small area on the Swedish west coast.** Journal of Molluscan Studies. v. 48, p. 167-173, 1982b.

JENSEN, H.F.; HOLMER, M.; DAHLLÖF, I. **Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*.** Marine Pollution Bulletin. v. 49, 2004.

JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. **Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória-ES.** Química Nova. v. 27, n. 3, p. 378-386, 2004.

KASS, G. E. N.; ORRENIUS, S. **Calcium signaling and cytotoxicity.** Environmental Health Perspectives. v. 107, n. 1, p. 25–35, 1999.

KENNISH, M. J. **Pollution impacts on marine biotic communities**, Boca Raton, Florida. CRC Press. 310 p. 1997.

KO, M.M.; BRADLEY, G.C.; NELLER, A.H.; BROOM, M.J. **Tributyltin contamination of marine sediments of Hong Kong**. Marine Pollution Bulletin. v. 31, p. 249-253, 1995.

KOHLMEYER, J., BEBOUT, B. **On the occurrence of marine fungi in the diet of *Littorina angulifera* and observations on the behavior of the periwinkle**. Marine Ecology. v. 7, p. 333-343, 1986.

KOTRIKLA, A. **Treatment Approaches of the Tributyltin Paint wastes from the Shipyards**, Paper Presented at the International Conference "Shipping in the era of Social Responsibility, Argostoli, Cephalonia, Greece. p. 14-16, 2009.

KRUITWAGEN, G.; PRATAP, H.B.; COVACI, A.; WENDELAAR BONGA, S.E. **Status of pollution in mangrove ecosystems along the coast of Tanzania**. Marine Pollution Bulletin. v. 56, p. 1022-1031, 2008.

LANGSTON, W. J., POPE, N. D. **Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments**. Marine Pollution Bulletin. v. 31, p. 32-43, 1995.

LEME, J. L. M. Morfologia geral dos Moluscos, em particular da Classe Gastropoda. In: BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1995.

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, R. I., WILLIAMS, G. A. **Extreme morphological diversity between two populations of *Littorina obtusata* (L.) from Iceland and United Kingdom**. Hydrobiologia. v. 309, p. 161-166, 1995.

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. 569-576, 2003.

MACIEL, N. A. L. **Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna do complexo estuarino-lagunar de Iguape-Cananéia, São Paulo, Brasil**. São Paulo, 252 p.2001.

MASSANISSO, P., DI ROSA, F., WILLEMSSEN, F., MORABITO, R. **Fate of TBT during seafood cooking**. 6th International Conference on Environmental and Biological Aspects of Main-Group Organometals (ICEBAMO), Pau, France, 2003.

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.

MERKT, R. E., ELLISON, A. M. **Geographic and habitat-specific morphological variation of *Littoraria (Littorinopsis) angulifera* (Lamarck, 1822).** *Malagologia*, v. 40, p. 279-295, 1998.

MILL, P. J., GRAHAME, J. **Shape variation in the rough periwinkle *Littorina saxatilis* on the wet and south coasts of Britain.** *Hydrobiologia*. v. 309, p. 61-71, 1995.

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.

MINCHIN, D., BAUER, B., OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., DUGGAN, C. B. **Biological indicators used to map organotin contamination from a fishing port, Killybegs, Ireland.** *Marine Pollution Bulletin*. v. 34, n. 4, p. 235-243, 1997.

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.** v. 1, p. 103-118, 2001.

MORCILLO, Y.; PORTE, C. **Monitoring of organotin compounds and their effects in marine molluscs.** *Trends in Analytical Chemistry*. v. 17, p. 109-116, 1998.

NEWKIRK, G. F., DOYLE, R. W. **Genetic in the rough periwinkle *Littorina saxatilis* on the west and south coasts of Britain.** *Hydrobiologia*. v. 30, p. 227, 237.

NORTH, W. J. **Size distribution, erosive activities, and gross metabolic efficiency of the marine intertidal snails, *Littorina planaxis* and *L. scutulata*.** *Biological Bulletin*. v. 106, p. 185-197, 1954.

OBERDÖRSTER, E.; MCCLELLAN-GREEN, P. **The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail *Ilyanassa obsoleta*.** *Peptides*. v. 21, p. 1323-1330, 2000.

OBERDÖRSTER, E.; MCCLELLAN-GREEN, P. **Mechanisms of a imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor.** *Marine Environmental Research*. v. 54, p. 715-718, 2002.

ODUM, E.P., HEALD, E.J. **The detritus bases food web of an estuarine mangrove community.** In: Cronin, L.E. Ed., *Estuarine Research*. Academic Press. p. 265-286, 1975.

OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; BAUER, B.; FIORINI, P.; MARDERT, B. **Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms**. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. v. 354, p. 540–545, 1996.

OEHLMANN, J., BAUER, B., MINCHN, D., SHULTE-OEHLMANN, U., FIORONI, P., MARKERT, B. **Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity**. Hydrobiologia. v. 378, p. 199-213, 1998.

PERILLO, G. M. E. **Geomorphology and sedimentology of estuaries**. Elsevier. 1996.

PONDER, W.F., LINDBERG, D.R. **Towards a phylogeny of gastropod molluscs – an analysis using morphological characters**. Zool. J. Linn. Soc. v. 19, p. 83–265, 1997.

PRINTRAKOON, C.; WEELS, F.E.; CHITRAMVONG, Y. **Distribution of mollusks in mangroves at six sites in the upper Gulf of Thailand**. The raffles bulletin of zoology. v. 18, p. 247-257, 2008.

RANTAKOKKO, P., KUNINGAS, T., SAASTAMOINEN, K., VARTIAINEN, T. **Dietary intake of organotin compounds in Finland: a market-basket study**. Food Addit

REID, D. G. **The Littorinid molluscs of mangrove morests in the Indo-Pacific Region: The genus *Littoraria***. British Museum, London. 1986.

RIGO, D. Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES. 2004. **Tese (Doutorado em Ciências em engenharia oceânica)** – Programas de Pós- Graduação de engenharia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2004.

RISTEMA, 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, p. 243-260, 1991.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, P., ENCINAR, J.R., ALONSO, J.I.G., SANZ-MEDEL, A. **Monitoring the degradation and solubilisation of butyltin compounds during in vitro gastrointestinal digestion using “triple spike” isotope dilution GC-ICP-MS**.

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.

RUPERT, E. E., FOX, R. S., BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª ed. São Paulo: ROCA, 2005.

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 granulose-like tumour cell line KGN.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 289, p. 198-204, 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.

SHAEFFER-NOVELLI, Y., CINTRON-MOLERO, G. **Guia para estudo de áreas de manguezal, estrutura, função e flora.** Caribbean Ecological Research. São Paulo, 150 p., 1986.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal:** ecossistema entre a terra e o mar. Caribbean Ecological Research, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G.; SOARES, M.L.G. Mangroves as indicators of sea level change in the muddy coast of the world. In: HEALY, T.R.; WANG, Y.; HEALY, J.A. **Muddy coast of the world:** processes, deposits and function. The Netherlands, Amsterdam. p. 245-262, 2002.

SCHWEINFURTH, H.A., GÜNZEL, P., 1987. **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 v. 1, 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.

SPALDING, M., BLASCO, F., FIELD, C. **World Mangrove Atlas.** Okinawa, Japan: The International Society for Mangrove Ecosystems. 178 p, 1997.

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.

STERNBERG, R. M., HOTCHKISS, A. K., LE BLANC, G. A. **The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta***. *General and comparative Endocrinology*. v. 156, p. 15-26, 2008.

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.

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.; 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.

SYASINA, I. G., SHCHEBLYKINA, A. V. **Morphofunctional characterization of the reproductive system of the gastropods *Littorina brevicula*, *L. mandshurica* and *Nucella heyseana* from uncontaminated and contaminated areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan**. *Russian Journal of Marine Biology*. v. 33, n. 6, p. 399-404, 2007.

THOMÉ, J. W., GIL, G. M., BERGONCI, P. E. A., TARASCONI, J. C. **Conchas das nossas praias**. 2ª ed. Porto Alegre: Redes Editora, 2010.

TITLEY-O'NEAL, C.P.; SPADE, D.J.; ZHANG, Y.; KAN, R.; MARTYNIUK, C.; DENSLOW, N.D.; MacDONALD, B.A. **Gene expression profiling in the ovary of Queen conch (*Strombus gigas*) exposed to environments with high tributyltin in the British Virgin Islands**. *Science of Total Environment*. v. 449, p. 52-62, 2013.

TSUDA, T., INOUE, D.T., KOJIMA, M., AOKI, S. **Daily intakes of tributyltin and triphenyltin compounds from meals**. *J. Assoc. O. Anal. Chemist. Int.* v. 78, p. 941–3, 1995.

TULLI, L. M. A., SANTOS, A. R., LOUZADA, F. L. R. O. **Evolução temporal do uso e ocupação do solo para os anos de 1978, 2003 e 2005 na Estação Ecológica da Ilha do Lameirão, Vitória-ES**. *Engenharia Ambiental*. v. 6, n. 3, p. 703-718, 2009.

VAN DEN BROECK, H., DE WOLF, H., BACKLEJAU, T., BLUST, R. **Effects of environmental stress on the condition of *Littorina littorea* along the Sheldt estuary (The Netherlands)**. *Science of the Total Environment*. v. 376, p. 346-358, 2007.

VAN DEN BROECK, H., DE WOLF, H., BACKLEJAU, T., BLUST, R. **Comparative assessment of reproductive impairment in the gastropod mollusk *Littorina***

littorea along the Belgian Sea Coast. Science of the Total Environment. v. 407, p. 3063-3069, 2009.

VERMEIJ, G. J. **Morphological patterns in high intertidal gastropods: adaptative strategies and their limitations.** Marine Biology. v. 20, p. 319-346, 1973.

VERONEZ JUNIOR, P., BASTOS, A. C., QUARESMA, V. S. **Morfologia e distribuição sedimentar em um sistema estuarino tropical: Baía de Vitória, ES.** Revista Brasileira de Geofísica. v. 27, n. 4, p. 609-824, 2009.

WOLANSKI, E., RIDD, P. **Tidal mucing and trapping m mangrove swamps.** Estuar. coast. Shelf Sci. v. 23, p. 759-771, 1986.

ZULOAGA, O.; PRIETO, A.; USOBIAGA, A.; SARKAR, S.K.; CHATTERJEE, M.; BHATTACHARYA, B.D.; BHATTACHARYA, A.; ALAM, MD.A.; SATPATHY, K.K. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Intertidal Marine Bivalves of Sunderban Mangrove Wetland, India: An Approach to Bioindicator Species.** Water Air Soil Pollut. v. 201, p. 305–31, 2009.