

FACULDADE CATÓLICA DO ESPIRITO SANTO

BRUNO NERES DAROS

**INDUÇÃO DE IMPOSEX EM *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767)
(Gastropoda: Muricidae) EXPOSTO À AGUA CONTAMINADA COM
TRIBUTILESTANHO (TBT)**

VITÓRIA
2014

FACULDADE CATÓLICA DO ESPIRITO SANTO

BRUNO NERES DAROS

**INDUÇÃO DE IMPOSEX EM *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767)
(Gastropoda: Muricidae) EXPOSTO À AGUA CONTAMINADA COM
TRIBUTILESTANHO (TBT)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como requisito obrigatório para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador:

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

VITÓRIA
2014

BRUNO NERES DAROS

**INDUÇÃO DE IMPOSEX EM *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767)
(Gastropoda: Muricidae) EXPOSTO À AGUA CONTAMINADA COM
TRIBUTILESTANHO (TBT)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo,
como requisito obrigatório para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em _____ de 2014 por:

Prof. MSc. Marcus Vinícius Scherrer Araújo , FCSES

Prof^a. Dra. Selma Aparecida Hebling, FCSES

Prof. MSc. Danilo Camargo Santos, FCSES

A Deus e aos meus pais, que me deram total apoio.

A imaginação é mais importante que a ciência,
porque a ciência é limitada, ao passo que a
imaginação abrange o mundo inteiro.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois é Dele a minha vitória e este novo passo em que dou na minha vida.

Aos meus pais e irmã por toda a compreensão e apoio que me deram nesses longos anos que se passaram, tornando a caminhada um pouco menos difícil e complicada.

Aos meus dois grandes irmãos que tenho guardado no peito, Icaro e Igor que apesarem de estarem longe, sempre que precisei eles estiveram a minha disposição e ao meu lado me dando forças e ajudando em cada decisão da minha vida.

Aos meus amigos que cultivei durante esses anos passados na faculdade, Marcella, Cecília, Fred e Otávio que sempre estiveram juntos nos trabalhos e nas horas de diversão.

A Rayane Garcia por que mostrou companheirismo durante todos os quatros anos em que estudamos juntos.

A todos meus outros amigos que fiz durante os quatros anos na faculdade que de alguma forma me fizeram feliz.

A Cristiane, Isabella, Janice, Betina, Larissa, Andréia e Ravena que sempre me apoiaram com mensagens de encorajamento, que acreditaram em mim mesmo quando parecia impossível.

Aos meus amigos Gilberto, Anderson, Rafaela, Rafhaela e Filipe que sempre me encheram com esses papos sem noção e diversão alegrando minha vida e também acreditando em mim.

A Mercia Barcellos da Costa, minha co-orientadora que me acolheu em seu laboratório por alguns anos e me guiou em momentos em que precisava com seus esporros e seus conselhos na hora certa, obrigado por tudo.

A Gabriela Zamprognno que mostrou toda paciência e calma do mundo para me ensinar o básico da estatística.

A Fernanda Tonini Gobbi que foi uma grande pessoa que me ajudou muito nessa etapa final do trabalho conversando comigo e me dando forças para não desistir, seus conselhos valeram bastante, obrigado.

Aos amigos que fiz no laboratório de Malacologia, Karina, Heitor, Milena, Ludmila e Marcella pelo apoio e momentos de diversão que passamos juntos.

A todos os professores que me ensinaram tudo o que eu sei, pois sem eles eu não seria muita coisa.

Ao professor Luiz Fernando e a Universidade Federal do Espírito Santo que me disponibilizou o laboratório para que o trabalho pudesse ser completado.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até onde cheguei.

RESUMO

Para impedir a incrustação de organismos nos cascos de navios houve a necessidade da criação de soluções, uma delas foi a introdução de tintas antiincrustantes à base de Tributilestanho (TBT). Porém se mostrou maléfico a organismos não alvos, causando efeitos maléficos impedindo-os até de se reproduzirem. Em organismos gastrópodes ocorre o desenvolvimento da anomalia chamada imposex, onde os indivíduos fêmeas passam a apresentarem características físicas masculinas. Sua intensidade é diretamente proporcional à intensidade de contaminação do local, e o tempo em que são expostos ao contaminante. O Estudo teve como objetivo induzir ao imposex indivíduos da espécie *Stramonita haemastoma* através de água contaminada por TBT, em concentrações de 5ng TBTL⁻¹ e 50ng TBTL⁻¹. Os indivíduos foram coletados em época de maré baixa em fevereiro de 2013 localizado na Praia de Coqueiral no município de Aracruz, Espírito Santo, Brasil onde sabe-se que a área não possui contaminação por TBT. 100 fêmeas foram divididas em cinco aquários cada um contendo 20 indivíduos sendo dois aquários para indivíduos adultos, dois para juvenis, e um aquário controle. Os animais foram analisados quinzenalmente, escolhendo um número de 20 animais aleatórios por análise, retirando 5 indivíduos de cada aquário. Os animais eram analisados utilizando o percentual de imposex (i%), índice de sequencia do vaso deferente (VDSI), o comprimento do pênis da fêmea (CPF) e a escala de seis estágios. Os resultados mostraram uma pequena diferença de resposta ao contaminante em relação aos juvenis e adultos, e em relação a diferença de concentração, a partir da segunda quinzena a concentração maior mostrou resultados maiores. O comprimento do pênis da fêmea teve uma média em 0,5cm acerca do tempo de exposição, porém foi encontrado um valor de 2,4cm obtido por um individuo adulto. Os níveis de VDSI em juvenis alcançaram valores maiores em relação em adultos, podendo alcançar valores de até 5 enquanto máximo encontrado nos adultos foi de 4. O índice de imposex encontrado em relação ao tempo exposto teve um aumento gradativo, alcançando um valor de 40% de indivíduos imposexados já na primeira análise para juvenis nas duas concentrações e 10% e 20% nas concentrações de 5ng TBTL⁻¹ e 50ng TBTL⁻¹ respectivamente nos indivíduos adultos.

Palavras-chave: Imposex. Organoestanho. Indução. Biomonitoramento. *Stramonita haemastoma*.

ABSTRACT

To prevent fouling organisms on the hulls of ships was necessary to create solutions, one of which was the introduction of antifouling paints based on Tributyltin (TBT). However proved harmful to non-target organisms, causing harmful effects preventing them up to reproduce. Organisms in the development of gastropods abnormality called imposex, where individuals spend the females showed male physical characteristics occurs. Its intensity is directly proportional to the intensity of contamination of the site, and the time they are exposed to the contaminant. The study aimed to induce imposex individuals of species *Stramonita haemastoma* through water contaminated by TBT at concentrations of 5 ng TBTL-1 and 50ng TBTL-1. Individuals were collected at the time of low tide in February 2013 located in Coqueiral Beach in Aracruz, Espirito Santo, Brazil where it is known that the area has no contamination TBT. 100 females were divided into five tanks each containing 20 individuals including two aquariums for adults, two for juveniles, and an aquarium control. The animals were assessed biweekly by choosing a random number of 20 animals for analysis, removing 5 individuals in each aquarium. The animals were analyzed using the percentage of imposex (I%), index sequence of vas deferens (VDSI), penis length of the female (CPF) and the scale of six stages. The results showed a small difference in response to the contaminant in relation to juveniles and adults, and in relation to the concentration difference, there was not much difference in the first half, but from the second half showed the highest concentration greater results. The length of the penis female averaged about 0.5 cm in the time of exposure, but was found to 2,4cm a value obtained by an adult. Levels in juvenile VDSI reached higher values than in adults, and can reach values of up to 5 as the maximum found in adults was already 4 in the final analysis. The index of imposex found in relation to the above time had gradually increased, although there was a large loss of mature individuals over the last two analyzes reaching a value of 40% of individuals have imposex in the first analysis for juveniles in both concentrations and 10% and 20% at concentrations of 5 ng and 50ng TBTL TBTL-1-one respectively in adults.

Keywords: Imposex. Organotin. Induction. Biomonitoring. *Stramonita haemastoma*.

LISTA DE SIGLAS

TBT – Tributilestanho

DBD – Dibutilestanho

MBT – Monobutilestanho

COE's – Compostos Orgânicos de Estanho

VDSI- Índice de Sequência de Vaso Deferente

CPF – Comprimento do pênis da fêmea

VD- Vaso Deferente

RPLI- Relative penis length index (Comprimento Relativo do Pênis)

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

IMO - International Marine Organization (Organização Marítima Internacional)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 BIOINCRUSTAÇÃO.....	23
2.2 COMPOSTOS ORGANOESTANICOS (COE'S).....	27
2.3 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS E SEUS RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA.....	30
2.4 EFEITOS DO TBT SOBE ORGANISMOS MARINHOS.....	33
2.5 IMPOSEX.....	40
2.6 TAXONOMIAS DO GÊNERO STRAMONITA.....	41
2.7 A IMPORTANCIA DA APLICAÇÃO DE INVERTEBRADOS EM PROGRAMAS DE BIOMONITORAMENTO.....	43
2.8 ESTRATÉGIAS DE MONITORAMENTO NO AMBIENTE.....	44
2.8.1 Monitoramento Biológico	44
2.8.1.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando Baling.....	45
2.8.1.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Imposex.....	45
2.8.1.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Intersex.....	46
2.8.2 Monitoramento Químico.....	47
2.8.2.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando Água.....	47
2.8.2.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Sedimento.....	48
2.8.2.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Material Biológico.....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 AREA AMOSTRAL.....	51
3.2 ESCOLHA DA ESPÉCIE.....	52
3.3 EXPERIMENTO EM LABORATÓRIO.....	52
3.4 ANÁLISE DE IMPOSEX.....	54
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
4.1 IMPOSEX.....	57
4.2 NÍVEIS DE VDSI.....	59
4.3 COMPRIMENTO DO PÊNIS DA FÊMEA (CPF).....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

A bio-incrustação é considerada uma comunidade de organismos que se estabelece e cresce nas superfícies externas de objetos submersos ou semi-submersos, tanto naturais como artificiais. Nos casos dos navios, essa obstrução pode produzir rugosidade que aumenta o fluxo turbulento, o ruído acústico e o arraste do navio, e também o aumento no consumo de combustível. Para solucionar o caso, foi necessário a criação de tintas antiincrustantes. Os primeiros meios utilizados para combater a incrustação foram as tintas à base de chumbo para navios de madeira, posteriormente, descobriu-se que o uso de cobre tinha uma melhor eficiência na proteção contra organismos incrustantes, porém altamente tóxicos ao ambiente. Logo precisou-se substituir pela tinta à base de TBT, o que acabou-se descobrindo também ser tóxica para animais não alvos (CHAMP; PUGH, 1987).

Os navios, por estarem em contato constante com a água do mar, estão sujeitos à bioincrustação, onde organismos como moluscos e algas se incrustam nos cascos. A bioincrustação compromete a eficiência de navegação causando vários prejuízos financeiros e principalmente o aumento de consumo de combustível implicando uma maior emissão de gases poluentes (GODOI et al, 2003).

Por essa razão sempre foi de interesse humano um modo de evitar a bioincrustação. Desde 1500-300 AC tentando descobrir uma solução eficiente, usavam a estratégia de revestir os barcos de madeira com uma mistura de óleo de baleia e chumbo ou cobre (DAFORN et al, 2011). Com a evolução das embarcações, novas opções foram necessárias. Uma proposta inicial foi a primeira geração de tintas anti-incrustantes, composta principalmente por óxido de cobre, inserido na matriz da tinta do navio. No entanto, não foi muito benéfico devido sua toxicidade e capacidade de contaminação e, por consequência, acabou sendo banida sua utilização (GODOI et al., 2003). A descoberta do tributilestanho (TBT) como um ótimo biocida para moluscos de água doce nos anos 60 permitiu o uso dessa substancia para ser usada como aditivo nas tinta para causar efeito antiincrustante, marcando assim a segunda geração de tintas antiincrustantes. (CHAMP; PUGH, 1987).

Posteriormente descobriu-se que, apesar de suas vantagens, o TBT era tóxico também em organismos não-alvos, principalmente para outros organismos marinhos, podendo atingir negativamente às algas (JENSEN; HOLMER; DAHLLÖF, 2004), moluscos (BAUER et al.,1997), esponjas (FAFANDEL; MÜLLER; BATEL, 2003),

peixes (AXIAK et al., 2000), crustáceos, equinodermos, mamíferos, aves marinhas (CASTRO; RODRIGUES-QUEIROZ; ROCHA-BARREIRA, 2007) e aos seres humanos (FERNANDEZ et al., 2006).

A contaminação por TBT pode causar um efeito chamado de Imposex em moluscos gastrópodes, onde as fêmeas de gastrópodes passam a apresentar características sexuais masculinas sobrepostas às suas características sexuais femininas originais (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). O desenvolvimento da masculinização de fêmeas é variado de acordo com a espécie contaminada, algumas sendo mais afetadas que outras, sendo também influenciado proporcionalmente pela movimentação de barcos da área por serem as principais vias de contaminação (GIBBS; BRYAN; PASCOE, 1991).

Devido ao seu alto poder de contaminação dos animais aquáticos, especialmente no que se refere aos efeitos androgênicos (MORCILLO; PORTE, 1998), em 2003 foi proposto pela International Maritime Organization (IMO) o banimento das tintas antiincrustantes à base de TBT, mas apenas em 2008 a lei entrou em vigor (EVANS; BIRCHENOUGH; BRANCATO, 2000; SANTOS et al., 2011; ABBOT et al., 2000).

Pelo TBT ter sido largamente usado como biocida para combater organismos incrustantes nos navios, tanto como industriais, embarcações de pescas e recreação, sua dispersão involuntária causou um efeito global na poluição das águas marinhas, observando-se contaminação nos litorais da Ásia (KO et al., 1995), Europa (AXIAK et al., 2000; DOWSON; BUBB; LESTER., 1994), Antártica (NEGRI et al., 2004) e Américas (SANTOS et al., 2011; STRAND; JORGENSE; TAIROVA, 2009).

Apesar da legislação se esforçar em combater o uso das tintas antiincrustantes a base de organoestanho e o Brasil estar de acordo, mesmo com a revisão da resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA 357/2005) que limita os padrões de qualidade de água no Brasil, pode ser encontrado taxa de Imposex em espécies de moluscos praticamente por toda sua extensão litorânea (FERNANDEZ, 2004).

Ultimamente muitos autores procuram estudar o efeito de imposex, analisando suas consequências através de várias metodologias, que vão desde o estudo direto de moluscos em áreas impactadas ou a indução através de exposição em laboratório ao TBT (MENSINK et al., 2002). São estudos importantes que ajudam a mostrar a

efetividade das concentrações do organoestanho ao mar aberto e o efeito que isso pode causar em espécies sensíveis (JENSEN; HOLMER; DAHLLÖF, 2004).

A exposição a esse contaminante pode causar deficiências imunológicas, reprodutivas e metabólicas aos organismos, podendo comprometer sua população e até acarretando em uma extinção, atingindo também mamíferos como humanos e roedores, comprometendo seu sistema endócrino, dando a importância de se estudar e entender os efeitos do TBT (COSTA et al., 2012).

Este trabalho tem como objetivo verificar o desenvolvimento de imposex em fêmeas juvenis e adultas da espécie *Stramonita haemastoma* e relacionar os índices de imposex, Índice de Sequencia de Vaso Deferente (VDSI) e comprimento do pênis de fêmea (CPF) em uma escala temporal e em função de duas diferentes concentrações de TBT (5ng TBT/L-1 e 50ng TBT/L-1). Apesar dos impactos ao ambiente causado pela contaminação de organoestânicos ser bastante estudado, é importante ter ciência das consequências que isto pode causar em várias espécies, como a espécie *Stramonita haemastoma* abordada neste estudo, que pelo Imposex ser uma anomalia que atinge o sistema reprodutor, acaba se tornando um caso sério a ser estudado pois pode levar à extinção da espécie se não bem entendido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOINCRUSTAÇÃO

A bio-incrustação é considerada uma comunidade de organismos que se estabelece e cresce nas superfícies externas de objetos submersos ou semi-submersos, tanto naturais como artificiais. Nos casos dos navios, essa obstrução pode produzir rugosidade que aumenta o fluxo turbulento, o ruído acústico e o arraste do navio, e também o aumento no consumo de combustível. Para solucionar o caso, foi necessário a criação de tintas antiincrustantes. Os primeiros meios utilizados para combater a incrustação foram as tintas à base de chumbo para navios de madeira, posteriormente, descobriu-se que o uso de cobre tinha uma melhor eficiência na proteção contra organismos incrustantes, porém altamente tóxicos ao ambiente. Logo precisou-se substituir pela tinta à base de TBT, o que acabou-se descobrindo também ser tóxica para animais não alvos (CHAMP; PUGH, 1987).

Estudos monitorando os níveis de TBT em espécies marinhas mostraram que em algumas espécies pode ser encontrado em suas glândulas digestivas e complexo da gônada, mostrando que a contaminação ocorre principalmente através da filtração de partículas de alimento contaminado. Anormalidade em conchas também pode ser vistos em algumas espécies de ostras, ocorrendo a diminuição em seu espessamento devido ao stress à exposição ao TBT, afetando o crescimento somático (AXIAK et al., 2000).

Exposição ao TBT em espécimes de *Littorina littorea* mostrou um grau de intersex, sendo o oviduto palial suplantado por uma próstata masculina substituindo os órgãos paliais femininos, porém apenas em fêmeas jovens e sexualmente imaturas o intersex pode ser observado pois a partir do momento que o oviduto palial se estabelece a fêmea perde sua sensibilidade ao TBT, enquanto nos machos a exposição pode ter relação em uma redução na glândula mamiliforme do pênis, não sendo capazes de se reproduzirem com sucesso (BAUER et al., 1997).

O TBT mostrou ser profundamente tóxico a vários organismos, em mamíferos, por exemplo, efeitos nos sistemas gonadais podem causar efeitos maléficos na reprodução em machos de ratos, prejudicando seus testículos, epidídimos, próstatas ventrais e até seus pesos foram afetados, podendo estar relacionado à diminuição de testosterona, inibição de aromatase e níveis de estrógeno, dependendo

principalmente ao nível de TBT exposto. Em mamíferos fêmeas, pode ser visto perturbações reprodutivas, podendo afetar o peso uterino e níveis de progesterona, apesar de não afetar o peso de ovário e níveis de estrógeno, podem induzir alterações fisiológicas e morfológicas, levando um desenvolvimento fetal e pós-fetal anormal (COSTA et al., 2012).

O TBT também pode causar efeitos negativos em espécies de plantas marinhas, podendo afetar no crescimento e atividade fotossintética, diminuindo consideravelmente, visto através de experimentos feitos expondo espécimes de *Ruppia marítima* à sedimentos contaminados por TBT. Observou-se também uma co-relação negativa entre clorofila a e as concentrações de TBT em culturas de fitoplanctons, indicando uma paralisação na produção de clorofila e uma redução na capacidade fotossintética (JENSEN; HOLMER; DAHLLÖF, 2004).

O TBT causa efeitos de imposex em várias espécies de moluscos, causando um declínio em suas populações devido à esterilizações em fêmeas e a baixa performance na reprodução devido a presença de um pênis e um vaso deferente que obstrui a abertura da vulva, tornando o estudo sobre o caso de grande importância, pois os efeitos podem causar problemas sérios para a fauna e até para humanidade (OEHLMANN et al., 1996).

Experimentos através da exposição a várias concentrações de TBT usando fêmeas adultas, adolescentes e juvenis mostraram que o desenvolvimento do imposex é mais sensível em fêmeas jovens e adolescentes, pois as fêmeas adultas não mostraram nenhum sinal de imposex durante um longo tempo de exposição por possuírem um sistema genital completamente desenvolvido (MENSINK et al., 2001).

Em Hong Kong, ao fazer análise de sedimentos do local pode ser visto uma intensa contaminação pelo organoestanho, chegando a encontrar, embaixo de guindaste de navios, uma concentração de 53 000 ng Sn g⁻¹, e em geral a concentração ficou em torno de 500 ng Sn g⁻¹. Comparado com concentrações encontradas ao redor do mundo (500-100 ng Sn g⁻¹), pode-se dizer que é um resultado alarmante. (KO, 1995).

Outro estudo feito em Ânglia Oriental calculando a eficiência do banimento de 1987 das tintas antiincrustantes à base de TBT foi escolhido doze pontos para análise de sedimentos da costa do local, sendo que cinco destes foram encontrados concentrações variando de 3 a 69 ng Sn g⁻¹. Os pontos com as maiores

concentrações foram os que possuem maior atividade de barcos e áreas portuárias (DOWSON; BUBB; LESTER., 1994).

Nas Ilhas virgens foi encontrada a presença de TBT, através da análise de moluscos bioindicadores, pela análise da presença de imposex, coletados perto de portos e áreas do litoral. Em alguns pontos pode-se observar uma taxa de 100% de indivíduos imposexados, outrora teve pontos que a taxa chegou apenas a 4% de imposex. (STRAND; JORGENSE; TAIROVA, 2009).

A contaminação por TBT na França mostrou ter um impacto considerado na produção de ostras, chegando a comparar com doenças causadas por parasitas ocorridas no passado. O banimento das tintas à base de TBT para barcos inferiores à 25m resultou em uma pequena diminuição da concentração do TBT na água e a perda de ostras cessou. Em apenas três anos a concentração de TBT caiu rapidamente, de 5 à 10 vezes menos. Porém com o banimento, voltou a ser usado as tintas baseada em cobre, causando um crescimento na concentração em águas marinhas costeiras (ALZIEU, 2000).

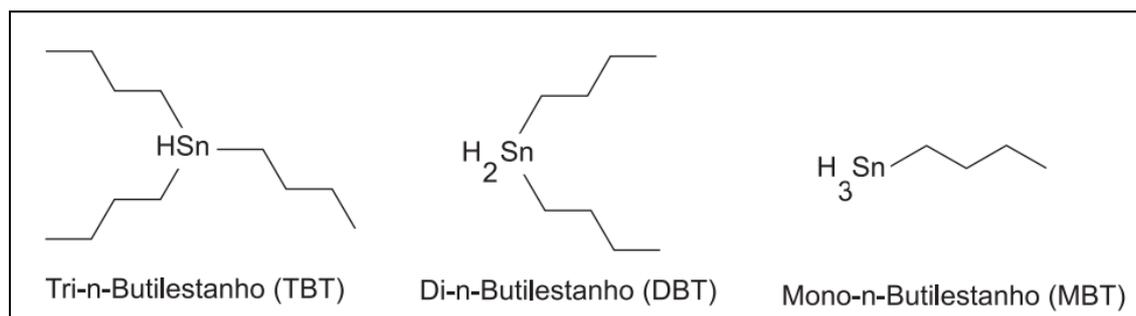
Tendo em vista a grande toxicidade das tintas antiincrustantes à base de TBT e seu banimento, foi necessário a utilização de novas opções de tintas, as chamadas terceira geração. Ao todo existem 16 biocidas diferentes podendo serem divididos em tintas que possuem metais em sua composição e aquelas que não possuem. Dentre os biocidas não metálicos, podemos citar o Irgarol 1051 e o Diuron, que apesar de ser uma boa opção, mostra ser um contaminante com grandes potenciais, pois afeta principalmente em atividades fotossintéticas em organismos fitoplanctônicos. Dos biocidas metálicos, não se tem muitos dados para toxicidade em águas salgadas, porém há indícios de toxicidade em larvas de espécies de peixes de águas salgadas para o biocida Ziram. (CASTRO; WESTPHAL; FILLMANN, 2011).

O tributil estanho em contato com o ambiente pode ser degradado através de exposição à radiação Ultra Violeta, podendo gerar Dibutil estanho (DBT), monobutil estanho (MBT) e também estanho. Estudos puderam comprovar que uma exposição à luz numa frequência de 190-290nm pode desencadear uma degradação ao composto de butil. O experimento pode mostrar também que a degradação do tributil estanho se dá gradativamente, observando um desaparecimento de TBT, um

aparecimento e desaparecimento quase que instantâneo de DBT e já um aparecimento de estanho nas amostras estudadas. (NAVIO, 1993).

Em um recente estudo feito por Toste et al. (2013) pode ser analisado uma relação na formação de vaso deferente em fêmeas da espécie *Stramonita haemastoma*, onde é comum visualizar espécimes apresentando um vaso deferente sem necessariamente um pênis formado, ou seja, afálicos. Foram analisados um total de 16 pontos, coletando 30 espécimes por ponto. No final do experimento foi possível visualizar três rotas possíveis no desenvolvimento do imposex, onde a primeira rota iniciada pela formação de um pênis, a segunda rota com uma formação do vaso deferente e a presença de um pré-pênis, e a terceira rota caracterizada pela formação do vaso deferente sem a presença de um pênis. O estudo conseguiu mostrar que a terceira rota é mais frequente em relação à distância da fonte de poluição pelo organoestanho. (TOSTE et al., 2013).

Figura 1 - Principais compostos organoestânicos presentes em ambientes marinhos.



Fonte: Modificado de Castro, I.B.; Rodrigues-Queiroz, L.; Rocha-Barreira, C. A., (2007)

O composto tributil-estanho (TBT) é caracterizado pela presença de uma molécula de Estanho (Sn^{4++}) acompanhado de 3 ligações covalentes de átomos de carbono (C_4H_9) podendo ser degradado ao composto dibutil-estanho (DBT) e posteriormente ao monobutil-estanho (MBT) (Figura 1) (ANTIZAR-LASDISLAO, 2007). Quando exposto na coluna d'água o TBT pode ser degradado em relativamente rápido, em um tempo de meia vida de aproximadamente 7 a 15 dias e quando em contato com o sedimento, o tempo de meia vida de degradação pode passar de um ano (FERNANDEZ et al, 2002).

No ambiente aquático, o TBT é rapidamente removido na coluna d'água e adere ao sedimento, pois possui uma alta densidade e uma baixa solubilidade. Podem ser encontradas altas concentrações em áreas costeiras, principalmente em portos e rotas de navegação. Os níveis de TBT encontrado em animais de nível trófico alto

são maiores do que em animais de níveis tróficos menores. Em humanos, pode se detectar concentrações de organoestânicos tanto no sangue como no fígado, apesar de pesquisas relacionadas ao nível de TBT em alimentos serem escassas, a ingestão dietética é provavelmente a principal via de contaminação (ANTIZAR-LADISLAO, 2007).

Muitas espécies de moluscos são ótimos bioindicadores para ambientes contaminados com organoestanho devido sua sensibilidade ao contaminante, como em um experimento feito por Smith et al. (2006), onde usou da espécie *Nucella lapillus* para monitorar uma área do Reino Unido, prendendo exemplares em gaiolas e expostos a vários locais escolhidos durante três e seis meses. Após o tempo determinado, as gaiolas foram retiradas e os exemplares analisados pode se observar nos locais mais impactados um maior índice de imposex em relação aos menos impactados, mostrando assim a espécie sendo um bom bioindicador de contaminação ao TBT, e também sendo um meio mais barato para monitoração de áreas possivelmente impactadas.

Experimentos comprovam o uso do imposex em fêmeas de gastropodes como uma ferramenta de biomonitoramento de poluição marinha, como visto em um trabalho de Axiak (2002). Usando exemplares da espécie *Hexaplex trunculus* de 25 localidades diferentes cobrindo toda a costa das Ilhas de Malta para análise, pode-se observar porcentagem alta em praticamente todos os pontos com atividades náuticas elevadas indicando um alto nível de contaminação por TBT nessas áreas, posteriormente comprovada em análise do sedimento superficial.

2.2 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS (COE's)

O ser humano com seu contato direto ou indireto no ambiente marinho consequentemente acaba por contaminar com poluentes químicos, e tais resquícios podem permanecer no ambiente tanto temporariamente quanto permanentemente (MORAES et al. 2001).

O casco de um navio quando submerso está vulnerável a qualquer tipo de incrustação que pode acarretar em um prejuízo, pois aumentam consideravelmente o atrito causado entre o casco e a água, perdendo assim velocidade, causando um maior esforço no motor e assim maior consumo de combustível, uma frequência de manutenção maior e uma introdução de espécies exóticas transportadas pelo casco. Tais consequências servem como justificativa para que o uso de substâncias

antiincrustante possa ser autorizado (MARINHA DO BRASIL, 2007; KOTRIKLA, 2009).

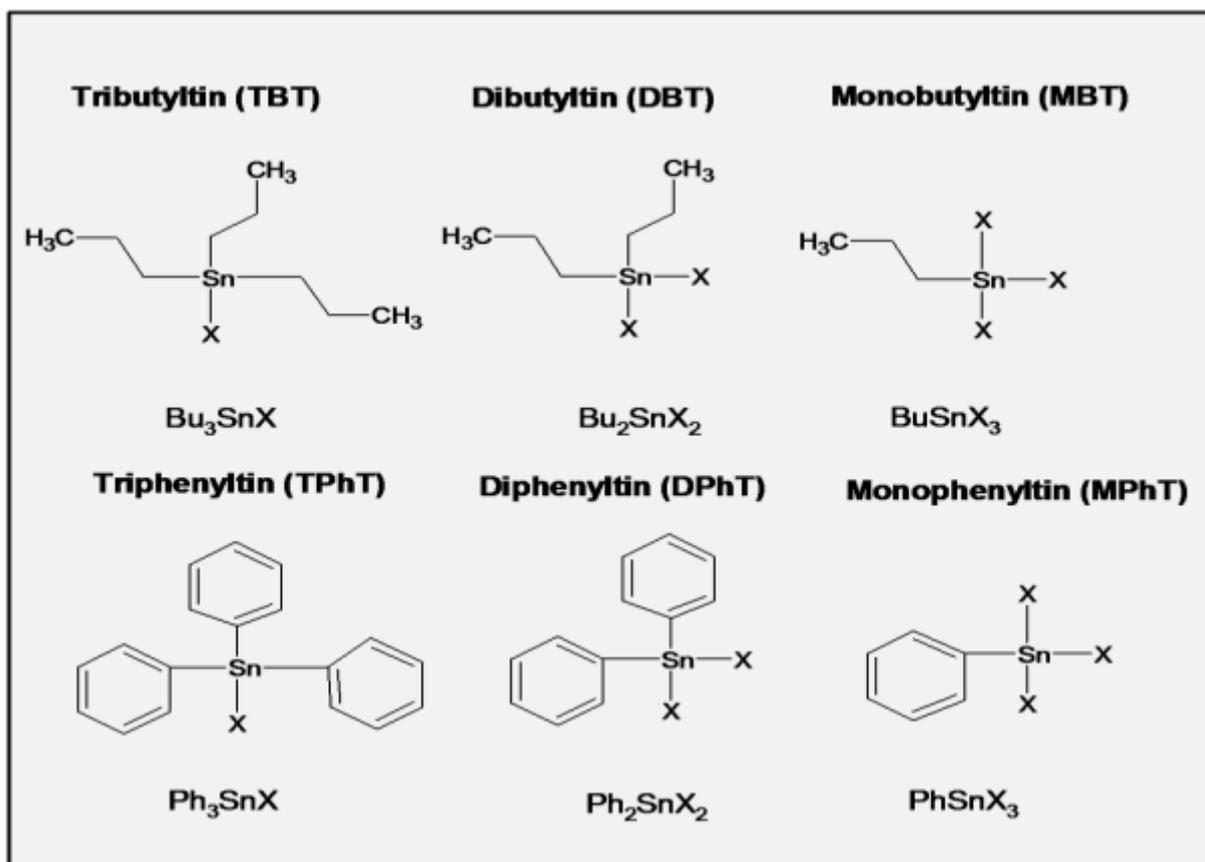
Existem registros por volta de 1500 a.C a 300 a.C no qual os fenícios usavam de tiras de cobres vinculadas nos casos de suas embarcações para evitar o desenvolvimento de organismos incrustantes (fouling), como por exemplos pequenos invertebrados e algas, pois entenderam quanto maior a suavidade do fundo das embarcações, mais facilidade era teria para velejar e um demandado de energia gasta seria menor (CHAMP; PUGH, 1987). Nos séculos XII e XIII também se usava o chumbo para evitar a incrustação de organismos, mas sua eficiência era inferior ao cobre (CHAMP; PUGH, 1987).

As tintas anti-incrustantes podem ser separadas em três tipos, a convencional ou de “associação livre”, onde os biocidas estão livres na tinta e liberados por lixiviação no ambiente, a matriz solúvel e ablativo, e os copolímeros de polimento (BAALS, 1987; CHAMP; PUGH, 1987). Os dois primeiros citados acima são considerados como as tintas convencionais, ambos utilizando de biocidas em forma de associação (CHAMP; PUGH, 1987). O terceiro, desenvolvido nos anos 70, é uma tinta hidrofílica, corroendo aos poucos dando a possibilidade um intervalo de manutenção maior, e por ter um resultado bastante satisfatório é utilizado bastante em iates (BAALS, 1987).

Os primeiros compostos orgânicos à base de estanho começaram a ser usado por volta de 1853, mas mesmo assim os compostos a base de mercúrio e arsênico tiveram seu uso bastante difundido até por volta de 1970 (CHAMP; PUGH, 1987; MARINHA DO BRASIL, 2007; SANTOS et al., 2011).

Os compostos organoestânicos são pertencentes a uma classe de organometálicos de poluentes (Figura 2), sendo composta por: Tributilestanho (TBT), Dibutilestanho (DBT), Monobutil-estanho (MBT), Trifenilestanho (TPhT), Difenilestanho (DPhT) e Monofenil-estanho (MPhT) (SANTOS et al., 2011).

Figura 2 – Compostos organoestânicos



Fonte: Santos et al., 2011.

Os compostos organoestânicos tem sua ampla utilização em biocidas em tintas antiincrustantes em embarcações marinhas, em pesticidas agrícolas e também em catalisadores em vários materiais, PVC e outros plásticos, sendo usado desde o início dos anos 70, sendo assim contaminantes encontrados tanto em ambientes marinhos e água doce, principalmente os trigorganoestanhos e o tributileno (TBT). (RISTEMA; LAANE, 1991; BAUER et al., 1997; MORCILLO; PORTE, 1998; DAHLLOF et al., 2001; FERNANDEZ, 2004; ANTIZAR-LADISLAO, 2008; CHOI et al., 2013).

Entretanto, essa contaminação por esses compostos, por terem uma toxicidade elevada, persistir no ambiente por muito tempo e ter a capacidade de se transferir na cadeia trófica acaba atingindo organismos não alvos, causando assim vários efeitos maléficos aos mesmos (LIMA et al., 2006). O TBT mostrou ter efeitos deletérios sobre vários organismos, como algas, crustáceos, esponjas, equinodermos, peixes, répteis, mamíferos e aves marinhas, e até a seres humanos através de 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).

Pesquisas com a espécie de ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) na década de 1970 mostraram a queda de produção de juvenis e alterações em sua concha, prejudicando sua reprodução, associando a contaminação do uso do TBT (ALZIEU, 1986). Enquanto outros estudos mostraram disrupções endócrina em gastrópodes da espécie *Nutella lapillus* (Linnaeus, 1758) (COSTA, 2012). Um dos efeitos mais prejudiciais do TBT é na desregulação endócrina, causando em moluscos o imposex, intersex e ovotestis, impedindo sua reprodução (OEHLMANN et al., 1998; COSTA, 2012). Dos efeitos citados, o imposex é o mais estudado, pois afeta aproximadamente 2000 espécies de gastrópodes em todo o mundo (STERNBERG et al., 2008).

2.3 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS E SEUS RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA

Há uma grande preocupação sobre os efeitos que o TBT pode causar nos seres humanos, devido sua alta toxicidade e os efeitos hormonais que ela causa em moluscos além de sua capacidade rápida de bioacumulação (SEKIZAWA et al., 2003; STRAND; JACOBSEN, 2005), e estes moluscos também são comercializados e estão presente na alimentação humana (ARAÚJO; ROCHA-BARREIRA, 2005; BOEHS; ABSHER; CRUZ-KALED, 2008)

A Organização Marítima internacional (IMO), ao ver esses fatores além de outras características tóxicas do composto, emitiu um tratado global proibindo o uso de tintas à base de TBT a partir do dia 1 de Janeiro de 2003, entrando em vigor no dia 1 de janeiro de 2008 (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Estudos em diversos países (BRYAN; GIBBS, 1991; MORCILLO; PORTE, 1998; HALLERS-TJABBES; KEMP; BOON, 1994; COSTA, 2012), tem descrito os efeitos biológicos causados pelos organoestânicos associados a embarcações em portos, estaleiros e marinas encontrando altas concentrações nestes locais (FERNANDEZ et al., 2006).

O consumo de mariscos, entre outros animais, (SEKIZAWA et al., 2003) é a principal via de contaminação para com os seres humanos, e a consumação desses alimentos contaminados com TBT impõe um risco para a população consumidora e

afetar até mesmo o turismo local (SWENNEN; SAMPANTARAK; RUTTANADAKUL, 2009).

Há relatos de que compostos de TBT causam irritações graves nas membranas da pele e mucosas, devendo assim evitar o contato direto na pele e olhos, e também evitar a inalação da poeira e névoa do composto (SCHWINFURTH; GUNZEL, 1987). E também com exposição constante essas irritações podem evoluir para dermatites graves (ALZIEU, (1998). Toxicidade hepatobiliar e linfotoxicidade são resultados encontrados de estudos de dose repetitiva predominantemente (KOTRIKLA, 2009).

Através de estudos em animais (GROTE et al., 2004) e estudos *in vitro* (SAITOH et al., 2001; CARFI et al., 2008) evidenciou-se o risco que estes compostos têm para a saúde humana naqueles que possuem sua nutrição alimentar principalmente em organismos marinhos (GUÉRIN et al., 2007). E em um desses estudos, viu-se que o TBT acaba alterando o desempenho da CA^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, elevando a concentração de cálcio intracelular e sinalizando para apoptose em timócitos (KASS; ORRENIUS, 1999).

O consumo de organismos marinhos tem sido considerado uma importante via de contaminação ao ser humano devido um aumento na preocupação da população sobre os efeitos que a exposição ao TBT pode acarretar à saúde humana (FORSYTH; JAY, 1997; AZENHA; VASCONCELOS, 2002; CHIEN et al., 2002). O TBT pode ser encontrado em alta concentração em produtos pesqueiros marinhos, e o nível de contaminação nos tecidos e sangue humano pode depender da dieta, porém as evidências sobre a exposição ao TBT ainda são limitadas (LO et al, 2003).

Apesar de países com altos índices em consumo de alimento de animais marinhos, os dados sobre níveis de COE's nesses alimentos são escassos (SANTOS et al., 2009). Desse modo, os riscos para a saúde humana baseiam-se em estudos imunológicos com animais experimentais e estimação em dieta humana de alimentos contaminados com TBT (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Devido a preocupante situação com a contaminação e exposição dos seres humanos ao TBT e sua consequência, criou-se um índice para que fosse possível 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 = 3×10^{-4} mg/kg/d

BWad = Peso corporal, adulto = 70kg

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

No Brasil o número encontrado para consumo de moluscos foi de 0,026 a 0,027, e são maiores que os encontrados nos Estados Unidos sendo no valor de 0,004, e em Taiwan os valores foram ainda maiores com o valor de 0,902 (FERNANDEZ et al., 2006). Os valores encontrados no Brasil para os pescadores artesanais foram de 1,005, próximo ao limite de risco com o valor de 1,0, sendo que nos Estados Unidos o valor novamente se encontrar superior com o valor máximo encontrado em 0,095 e se encontrando menor que em Taiwan que encontraram valores de 1,602 até 3,713. (FERNANDEZ et al., 2006).

Pesquisas realizadas no Japão (TSUDA et al., 1995) mostraram que a as mercadorias de frutos do mar comercializadas apresentaram altas concentrações de TBT (185 ng). Dos locais estudados, o que houve o maior número de compostos

organoestânicos diferentes encontrados nos alimentos comercializados foi em Kuopio, localizado na Finlândia (RANTAKOKKO et al., 2006) onde os compostos encontrados foram o TBT, encontrado em níveis de até 2,53ng, o MBT com 1,52ng, TpHT com 1,11ng e o DBT com 0,25ng.

Para seres humanos o perigo da contaminação por COE's não é apenas pela solubilização, mas existe a possibilidade de degradação durante a sua digestão, observando-se que o padrão de permeabilidade é relacionada com o padrão geral de toxicidade *in vivo* (triaquilestanho > diaquilestanho >> monoaquilestanho), Porém a acumulação é diferente de acordo com o composto (DBT > TBT > MBT) (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Foram feitos testes gastrointestinais *in vitro* usando um extrato especial para que pudesse ser feito uma simulação da absorção gastrointestinal do butilestanho nos seres humanos, e foi observado que o DBT se destacou como a degradação mais importante para a produção do MBT (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2005). Observou-se também que não ocorre a degradação do bitulestanho durante o processo de cozimento fazendo com que os resultados se tornem significativo (MASSANISSO et al., 2003).

É preocupante para os pesquisadores a situação da contaminação dos sedimentos por TBT. É necessário novas pesquisas para criação de soluções sustentáveis para a remoção do TBT contaminado no sedimento, novas pesquisas na área de toxicidade, sobre a ingestão e consequências na saúde dos seres humanos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

É importante também se preocupar com as mudanças do clima em relação ao TBT, tanto ambiental quanto na área econômica, sendo que essas mudanças nos ambientes de costas podem afetar a temperatura, a salinidade, radiação solar, o CO₂ dissolvido na água, afetar o pH, afetando o poder de intoxicação que o TBT pode causar (ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

2.4 EFEITOS DO TBT SOBRE ORGANISMOS MARINHOS

O imposex foi primeiramente encontrado na espécie *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758) em uma pesquisa feita na Inglaterra (BLABER, 1970). Assim no final de 1970 observou-se os efeitos causados pela contaminação por TBT na França em um de seus pequenos portos na Baía de Arcachon (ALZIEU et al., 1986; ALZIEU, 2000).

Pode-se observar uma queda de indivíduos de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), por causar uma inibição da calcificação das larvas da espécie, consequentemente causando a mortalidade ainda na fase de larva, a falência reprodutiva e também uma formação deformada nas conchas nos indivíduos capazes de alcançar a fase adulta (MICHEL; AVERTY, 1999; ALZIEU, 2000, 1986).

Pesquisas feitas em todo o mundo já mostraram cerca de 200 espécies de neogastrópodes capazes de sofrerem consequências e sofrerem imposex ao serem contaminadas pelo TBT (TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011), e os pesquisadores estão também explorando novas espécies de mesogastrópodes. Já houve pesquisas com a espécie de *Cymatium parthenopheum parthenopheum* e também estudos com a espécie *Littoraria angulifera*, sendo as duas mais resistentes ao TBT (VISHWAKIRAN et al., 2006).

No Brasil casos de imposex foram encontrados na espécie *Stramonita haemastoma* na Baía de Santos em Rio de Janeiro (MAGALHÃES et al., 1997), sendo novamente encontrado novas ocorrências na espécie novamente no Rio de Janeiro porém na Baía de Guanabara (FERNANDEZ et al., 1998) e no Ceará (CASTRO et al., 2000).

Os navios de grande porte quando são atracados para manutenção como a pintura e raspagem do casco tem sido apontada como a causa principal para a contaminação das espécies por TBT (BAILEY; DAVIES, 1988), devido a resultados de experimentos em campo e laboratoriais de indução ao imposex em várias espécies de gastrópodes (SHIM et al., 2000; BECH et al., 2002; RIBEIRO, 2002; CASTRO, 2005) e laboratoriais (GIBBS et al., 1987; LIMA, 2004).

O imposex tem sido de grande preocupação pois os efeitos causados em espécies contaminadas chegam a afetar sua reprodução deixando as fêmeas estéreis, como mostrado em pesquisas nas espécies *Nucella lapillus* e *Ocenebra erinacea* (GIBBS et al., 1991). Pesquisas relatam também em 1960 a espécie *Stramonita haemastoma* foi gravemente prejudicada na Baía de Guanabara, e nos finais de 1990 na mesma região a população já não se encontrava presente (FERNANDEZ, 2004).

As fêmeas ao terem seu órgão genital ser diferenciado a um órgão masculino devido a inibição do Citocromo P450, impedindo que a testosterona seja convertida causando assim um aumento de testosterona em seus tecidos (LEUNG et al., 2006)

levando assim o bloqueio da abertura vaginal e rompendo também a glândula da capsula pelos tecidos da epiderme se desenvolve acerca do vaso deferente (GIBBS; BRYAN, 1986).

O TBT se mostra tóxico causando imposex em gastrópodes até mesmo em níveis muito baixos na água do mar (BRYAN et al., 1986; HUGGETT et al., 1992) além de causar efeitos maléficis em outros animais como interferindo na sua defesa imunológica, ou até afetando seu DNA (BRYAN e GIBBS, 1991; ALZIEU, 2000).

O TBT pode interferir em organismos dependendo da quantidade em que são expostos ao contaminante, como por exemplo em bivalves que se expostos a valores menores que $1,2\mu\text{g L}^{-1}$ inibem sua fase planctônica e se forem expostos a $34\mu\text{g L}^{-1}$ interferem a eclosão de lavas de ascídeas (RUIZ et al., 1996). Já em larvas de *Stramonita clavigela* impede o seu desenvolvimento ao entrarem em contato à concentração de de 1 a $5\mu\text{g TBTL}^{-1}$ em 48 horas (HORIGUSHI et al., 1998).

Estudos feitos a partir da *Nucella lapillus* mostrou a possibilidade de que as rotas de desenvolvimento do imposex poderia haver diferenças genéticas, associadas ao polimorfismo cromossomal (OEHLMANN et al., 1991). Outras pesquisas mostraram também que pequenas populações de *N. lapillus* sobreviveram enquanto a maioria havia se perdido pela contaminação por organoestânicos. Uma anomalia foi encontrada em machos, de nome Síndrome de Dumpton, onde o órgão genital masculino sofre de um subdesenvolvimento, enquanto as fêmeas da população apresentaram uma resistência à contaminação desenvolvendo níveis menores de imposex (GIBBS et al., 1991).

Outro tipo de anomalia em fêmeas também foi descrita, a ovo-testis, onde a fêmea passa a ser considerada como macho por haver um desenvolvimento de espermatogênese e túbulos seminíferos ao invés da oogênese, sendo visto primeiramente na espécie de *N. lapillus* ao ser exposta laboratorialmente ao TBT ao longo de dois anos (GIBBS et al., 1987). Outras espécies também apresentaram essa anomalia como a *Ocenebrina articulata* (OEHLMANN et al., 1996), *Nassarius reticulatus* (BARROSO; MOREIRA, 1998), *Babylonia japônica* (HORIGUCHI et al., 2006).

Por a utilização de tinta antiincrustantes serem amplamente usada globalmente e havendo o problema de contaminação do TBT a organismos não alvos em todo o

mundo (ELLIS; PATTISINA, 1990), acabou por consequência causando a proibição de antiincrustantes em embarcações em vários países (FOLSVIK et al., 1998).

Com a repercussão da diminuição de espécimes de *C. gigas* por consequência do efeito causado pelo TBT em tintas antiincrustantes, a França resolveu criar uma lei para proibir o uso de tintas antiincrustantes à base de TBT por três meses experimentalmente (MICHEL; AVERTY, 1999; ALZIEU, 2000, 1986; CHAMP, 2000; YEBRA; KILL, DAM-JOHANSEN, 2004). Após isso a lei proibiu o uso de tintas com 3% de TBT para embarcações menos que 25 metros de comprimento que navegavam a Costa do Atlântico e após isso ainda meses depois do mesmo ano, a lei cobriu toda a costa francesa (WHO, 1990).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) proíbe o uso das tintas antiincrustantes à base de TBT para o Japão onde a lei adotada no país a partir de Dezembro de 1979, se diz respeito a proibição de compostos de TBT em produtos têxteis destinados a uso doméstico, e na Austrália foi implantada a lei controlando o uso de tintas antiincrustantes à base de TBT para barcos inferiores a 25 metros de comprimento, e para embarcações maiores com uma taxa de lixiviação de 5.0 ng/cm² por dia. No Canadá, Nova Zelândia e Austrália a proibição começou a valer a partir de 1989 e na Europa a partir de 1991 (EVANS, 2000).

Em 1993 foi adotada uma lei restringindo o uso de tintas à base de TBT em Portugal para embarcações de pequeno porte, assim as embarcações maiores ficaram fora da legislação, assim o uso da tinta antiincrustante continuou valendo para essas embarcações tendo então um grande impacto nos portos comerciais e pesqueiros da área (BARROSO et al, 2000).

Com as tintas antiincrustantes causando muitos problemas ambientais, em 1988 a International Maritime Organization (IMO) selecionou técnicos para estudar os efeitos das tintas antiincrustantes causados no ambiente e na saúde humana, onde levaram a precisar a adotar a Resolução A.895 (21), em 1999, que recomendou medidas propondo limites ao uso das tintas antiincrustantes à base de TBT (MARINHA DO BRASIL, 2007).

Em 2001, a Convenção de Sistemas (AFS) sugeriu, através da aprovação pela IMO, um banimento global às tintas antiincrustantes à base de TBT devido sua ação

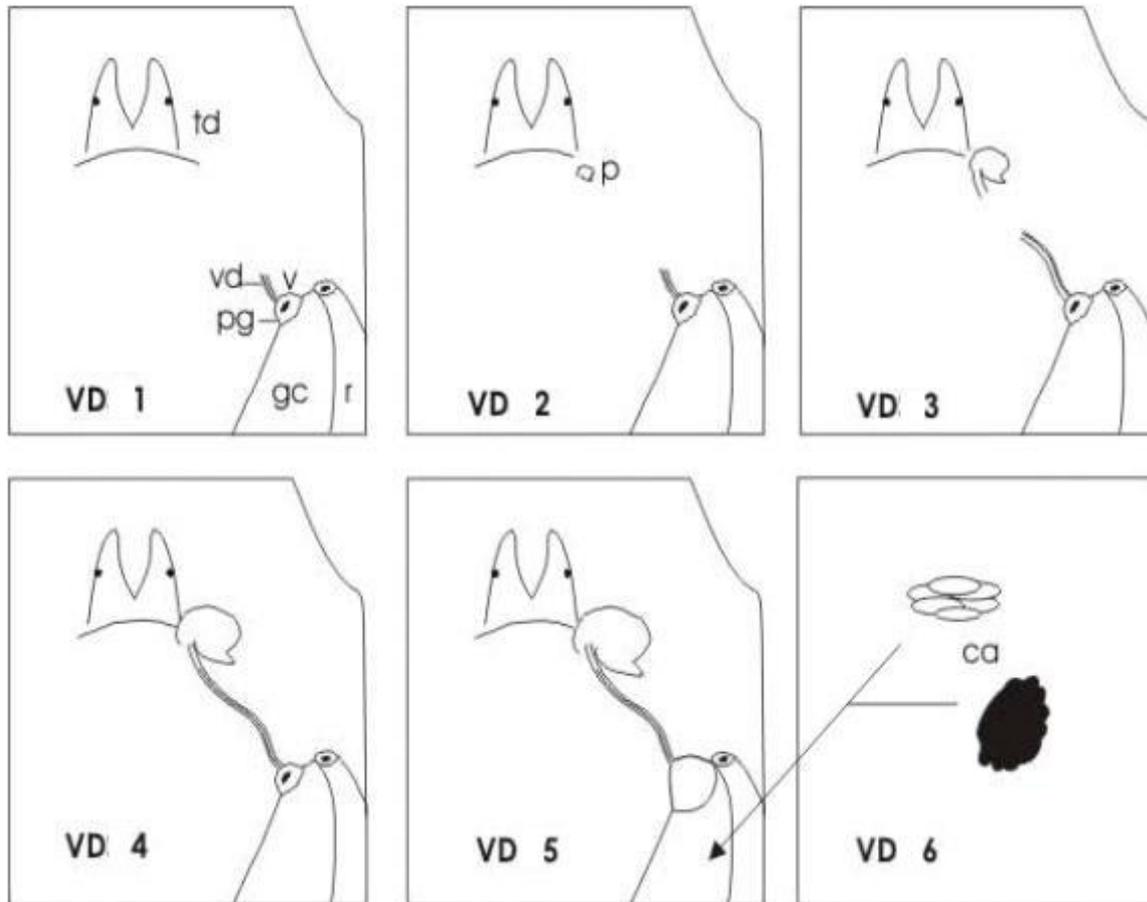
degradante ao meio ambiente a partir de janeiro de 2003, e adotada posteriormente em 2008 (MARINHA DO BRASIL, 2007).

O Ministério do Meio Ambiente em 2005 aprovou a Resolução CONAMA 357/05, estabelecendo um valor máximo permitido para água doce, podendo chegar até 2µg/L TBT, para a água salina atingindo até um valor de 0,01µg/L TBT e águas salobras podendo chegar a 0,010µg/L TBT, mas apenas em 2008 que a IMO decretou a proibição do uso de tintas antiincrustantes em navios (SANTOS et al., 2011). Mesmo após a proibição encontra-se níveis de TBT altos presentes no sedimento e também em organismos da meiofauna e macrofauna (DOWSON et al., 1994; KO et al., 1995; DAHLLOF et al., 2001; ANTIZAR-LADISLAO, 2008; COSTA, 2012).

Existem alguns biocidas tintas antiincrustantes à base de compostos que também são prejudiciais ao meio ambiente mesmo em baixas quantidades, e por persistirem no ambiente, como o Diurou e o Irgarol 1051, e também existem leis proibindo seu uso em alguns países (DAFFORN; LEWIS; JOHNSTON, 2011; CRESSWELL, 2006). Na Austrália houve a proibição das tintas à base de Diurol enquanto na Holanda foi a de tintas à base de Irgarol 1051 (BANNINK, 2004) e ambos na Dinamarca (DEPA, 2008)

A espécie *Nucella lapillus* se mostrou ser uma das espécies mais sensíveis à bioindicação de poluição ao TBT, e por essa razão se tornou uma das mais estudadas atualmente (TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011). Foi descrito para essa espécie o desenvolvimento do imposex em seis estágios (FERNANDEZ et al., 2002; GIBBS et al., 1987).

Figura 3 - Escala VDSI proposto por Gibbs e outros (1987) para a espécie *N. lapillus*. td: tentáculo direito; vd: vaso deferente; pg: papila genital; gc: glândula da cápsula; p: papila; r: reto; ca: cápsulas ovíferas

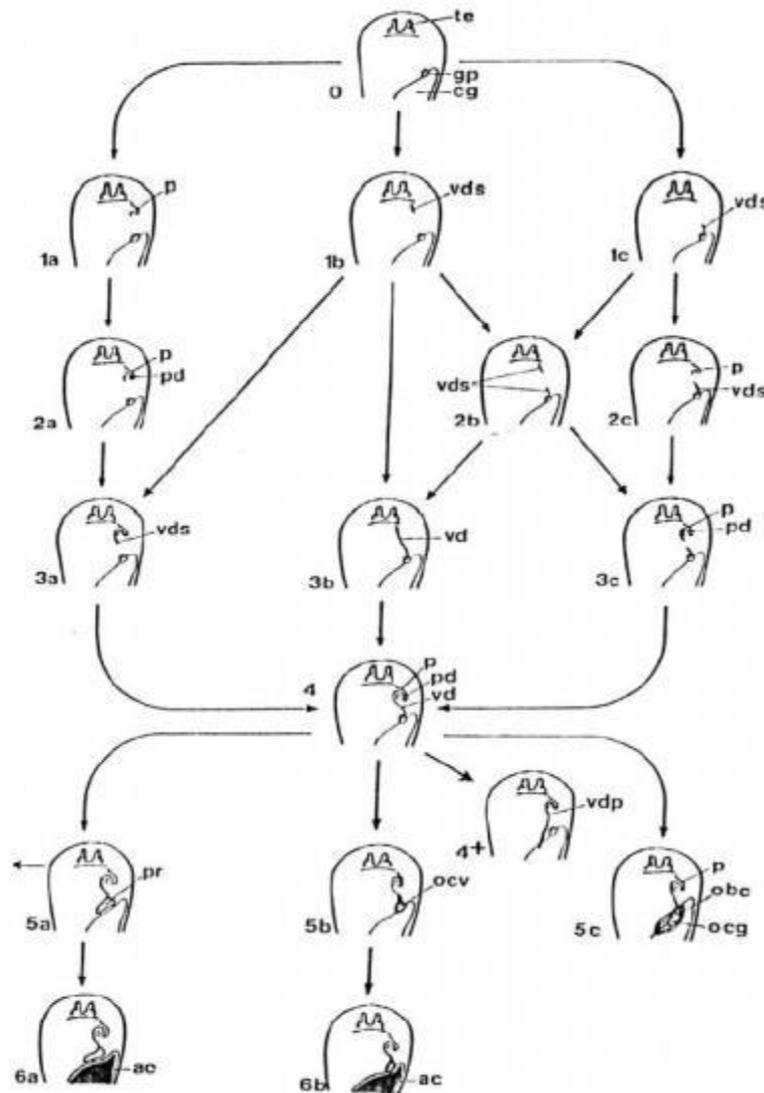


Fonte: Adaptado de Gibbs et al., 1987.

No estágio 1 o vaso deferente (VD) começa seu desenvolvimento sem a formação do pênis, que só aparece a partir do estágio II, no estágio II o VD já se encontra num desenvolvimento avançado porém não completo, que só é alcançado no estágio IV, no estágio V, a fêmea passa a ter sua papila genital bloqueada, o a fêmea é considerada no estágio VI quando sua glândula da capsula se encontra com cápsulas ovíferas e a papila genital bloqueada impedindo que elas sejam expelidas (Figura 3) (GIBBS et al., 1987).

Estudos também mostraram rotas alternativas do surgimento do pênis e vaso deferente para espécies *Trivia arctica*, *Trivia monacha*, *N. lapillus*, *Ocenebra erinacea*, *Hinia incrassata* e *Hinia reticulata* (Figura 4) levando a criação de um índice para essas rotas (BAUER et al., 1995).

Figura 4 - Desenvolvimento de imposex. Ac: cápsulas abortadas; cg: glândula da cápsula; gp: papila genital; obc: bursa copulatrix aberta; ocv: oclusão da vulva; p: pênis; pd: ducto penial; pr: próstata; te: tentáculo; vd: vaso deferente; vpd: passagem do vaso deferente pela glândula da cápsula; vds: secção do vaso deferente.



Fonte: Stroben et al. (1992).

Estudos feitos com a espécie *Stramonita haemastoma* estabeleceram uma escala de quantificação de estágios de imposex. O estágio 0 é dito para as fêmeas saudáveis. O estágio I considera as fêmeas apresentando um pré-pênis ou pretuberância atrás do tentáculo direito onde é encontrado o penis normalmente em machos. No estágio II considera as fêmeas onde já é possível visualizar um pequeno pênis se formando. No estágio III já é possível ver um aumento no pênis e já observar o vaso deferente no teto da cavidade palial ainda incompleto. O estágio IV considera as fêmeas que possuem já o vaso deferente completo e o pênis da

fêmea se encontra em um tamanho maior que o da metade do tamanho dos machos. O Estágio V considera as fêmeas que já possuem a vulva bloqueada pelo vaso deferente. E o estágio VI é considerado as fêmeas que possuem a vulva bloqueada pelo vaso deferente e sua glândula da capsula preenchida com massas de ovos (FERNANDEZ et al., 2002).

Para a fim de comparar resultados, houve a necessidade de se criar um método para quantificar a intensidade de imposex. Foram criados os índices: Porcentagem de incidência de imposex (I%), o Índice de comprimento relativo do pênis (RPLI) e Índice de tamanho relativo do pênis (RPSI) e o Índice de sequência do vaso deferente (VDSI) criado para demonstrar a evolução do canal do vaso deferente nas fêmeas e é calculado como valor médio de estágios de imposex num experimento, sendo ele o mais significativo pois através dele é capaz de estimar se a espécie trabalhada corre risco de redução na reprodução (BARROSO et al., 2000; OEHLMANN et al., 1996).

Mas também os outros índices também são usados para estimar se uma espécie está comprometida no ambiente ou não devido a contaminação pelo TBT. Como por exemplo a porcentagem de incidência de imposex (%) ou a porcentagem de fêmeas afetadas e os índices RPLI (Índice de comprimento relativo do pênis) e RPSI (Índice de tamanho relativo do pênis) que relacionam o tamanho do pênis da fêmea com o macho (GIBBS et al., 1987; GIBBS; BRYAN, 1986; MINCHIN et al., 1997; OEHLMANN et al., 1991).

2.5 IMPOSEX

Uma das características desses compostos de tinta antiincrustantes é afetar principalmente organismos marinhos da classe Gastropoda, através do desenvolvimento do imposex que como já foi dito, ocorre a masculinização de fêmeas. Como consequência, as fêmeas afetadas são incapazes de se reproduzirem o que pode acarretar numa extinção da espécie no local contaminado (BRYAN et al., 1986; GIBBS; BRYAN, 1987) considerado como um caso clássico de desregulação endócrina (MATTHIESSEN; GIBBS, 1998). O imposex pode ser desenvolvido dependendo da concentração do TBT no ambiente, sendo sua magnitude cada vez maior proporcionalmente à concentração encontrada (GIBBS; BRYAN, 1996; ALZIEU, 2000).

As espécies diferem muito ao sofrerem a masculinização, devido terem sensibilidade diferentes ao composto (GIBBS et al., 1997), considerando então o imposex sendo uma resposta de sensibilidade muito alta ao contaminante, tendo a possibilidade de usar como bioindicador para diferentes níveis de contaminação (GIBBS; BRYAN, 1994, 1996). Pelo desenvolvimento do imposex ser bem específico em cada espécie a sensibilidade também se torna específica de acordo (BAUER et al., 1995).

2.6 TAXONOMIAS DO GÊNERO STRAMONITA

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 registros de moluscos encontrados até hoje, tem sua datação estimada de 570 milhões de anos, sendo do Período Cambriano da 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).

O Filo Mollusca, depois de Arthropoda, é o maior do seu reino, Metazoa, sendo constituído por sete classes, sendo elas Aplacophora, Monoplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, Cephalopoda, Bivalvia e Scaphopoda. (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). São invertebrados não segmentados, e suas características principais são de terem um corpo mole protegido por uma concha calcária podendo ser externa ou interna dependendo da classe, seu trato intestinal, coração, gônadas e rins estão espalhados pela massa visceral, e possuem uma cabeça e uma boca (RUPERT; FOX; BARNES, 2005; THOMÉ et al., 2010).

Gastropoda^C

A classe Gastropoda, das sete citadas acima, é a classe trabalhada nesta pesquisa, sendo composta pelos 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).

Prosobranchia^{SC}

Os Prosobrânquios são dioicos, ou seja, possuem macho e fêmea, suas brânquias e cavidade do manto se encontram na parte anterior do seu corpo (LEME, 1995). É um grupo parafilético (RUPERT; FOX; BARNES, 2005).

Todos presente neste grupo possuem concha, exceto os integrantes de Titiscaniidae, (LEME, 1995). Sua cavidade de manto se encontra na parte anterior de seu corpo, e o opérculo é presente na maior parte dos integrantes, e uma minoria possui um átrio direito (RUPERT; FOX; BARNES, 2005). A maior parte são de habitat marinho, mas também podem ser encontrados em água doce e terrestre (RUPERT; FOX; BARNES, 2005).

Caenogastropoda^O

Os Caenogastropoda são um grupo bem diverso, sendo dividido em dois grupos, os Mesogastropoda e o Neogastropoda (RUPERT; FOX; BARNES, 2005), apresentando 136 famílias, dentre elas 65 já extintas e 41 super famílias (BOUCHET; ROCROI, 2005).

As espécies desse grupo são bastante procuradas no comércio de conchas, tanto as marinhas quanto as de água doce e terrestres (COLGAN et al., 2006), por possuem conchas de morfologia bem complexas. Essas espécies podem ser encontradas nos mais variados habitats. (COLGAN et al., 2006).

Stramonita^G

Conchas pertencentes ao gênero *Stramonita* podem ser caracterizadas por uma forma fusiforme oval, com uma angulação geralmente turbeculadas por nervuras axiais curtas, e uma escultura espiral variando de cinco cordões primários com segmentos intermediários para m grande número de cordões indiferenciados. O bordo exterior é planar e fortemente crenulados na borda. O lábio interior apresenta duas ou mais nervuras oposta ou dirigida para longe a partir do vértice fracas que não se estendem para dentro da abertura. A extremidade do lábio Perto ou em direção ao ápice exterior estende-se apenas ligeiramente em frente da nervura parietal para formar um canal curto. (VERMEIJ, 2001).

Atualmente existem dois grupos do gênero *Stramonita*, sendo que ambos já estavam presentes no primeiro aparecimento do gênero em Venezuela. O primeiro grupo é representado na fauna de *Stramonita haemastoma* e suas subespécies do Atlântico tropical, *S. biserialis* (Blainville, 1832) a partir do nordeste do Pacífico e *S. rustica* (Lamarck, 1822) do noroeste do Atlântico. O segundo grupo é representado pelas espécies *S. bicarinata* (de Blainville, 1832), das Ilhas de Ascensão do Sul no Atlântico e Santa Helena, *S. quadridentata* Vokes, 1989, a partir do final do Mioceno na República Dominicana e Panamá, e *S. semiplicata* Vermeij 2001 na Venezuela. Este grupo também é representado por uma ou mais espécies do Mioceno para Plioceno ao sul da Europa e várias formas recentes do Oeste do Pacífico. (VERMEIJ, 2001).

2.7 A IMPORTÂNCIA DA APLICAÇÃO DE INVERTEBRADOS EM PROGRAMAS DE BIOMONITORAMENTO

O monitoramento consiste em observar sistematicamente fatores que indicam problemas específicos, com o fim de obter informações de determinado local ou objeto estudado, permitindo assim identificar suas condições e variação em um certo período de tempo (TOMASI, 1977; BAPTISTA, 2008).

O uso de organismos vivos para monitoramento quantitativo e qualitativo na poluição ambiental é bem eficaz pois estão continuamente expostos ao ambiente ao longo do tempo, repercutindo as modificações ambientais, o que outros métodos acabam falhando em mostrar (TOMMASI, 1977; TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011).

Indicadores biológicos são vastamente estudados, pois com ele, aliado a outros estudos, como físicos e químicos, consegue-se ter uma noção maior do impacto que a poluição pode causar sobre um ambiente, sendo uma ótima ferramenta no auxílio do monitoramento (TOMMASI, 1977; MAGALHÃES; FERRAO-FILHO, 2008; HARA et al., 2009). Os moluscos se destacam como ferramentas de biomonitoramento por serem organismos com uma visibilidade alta, sua importância econômica e ecológica serem expressivas, terem uma distribuição abrangente e como maioria possuem um modo de vida sésil, há a possibilidade de fazer levantamentos temporais. (TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011).

Através de várias pesquisas realizadas os moluscos se mostraram serem os mais sensíveis aos efeitos maléficos do TBT (BRYAN; GIBBS, 1991). Desenvolveram-se então índices para quantificar o imposex nos indivíduos a fim de utiliza-los como um parâmetro na monitoração de locais contaminados pelo TBT. Monitoramentos feitos em locais contaminados utilizando-se do imposex como fator, evidenciaram uma relação na contaminação e a quantidade de indivíduos contaminados, inclusive na concentração de TBT encontrado nos locais em relação ao nível de imposex (GIBBS; BRYAN, 1987; SANTILLO et al., 2001).

2.8 ESTRATÉGIAS DE MONITORAMENTO NO AMBIENTE

O monitoramento de locais contaminados pelas tintas antiincrustantes à base de TBT podem ser feitos através de um monitoramento biológico, onde analisa as modificações causadas pelo TBT nas populações, ou um monitoramento químico da água, do sedimento ou até mesmo dos próprios organismos. A técnica mais usada é o monitoramento biológico usando a avaliação do imposex (EVANS et al., 1998; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998). É a mais utilizada devido seu custo ser menor em relação ao monitoramento químico, que é difícil de analisar a taxa de limite de identificação do TBT em relação ao exposto no ambiente, que possui uma complexidade de distribuição no ambiente (EVANS et al., 1998).

2.8.1 Monitoramento Biológico

A monitoração dos ambientes contaminados pela tinta à base de TBT tem uma certa facilidade devido a sua quantidade de variantes, podendo ser uma variante do espaço, ou de tempo em cada local, a presença de barcos e as expressões físicas, geológicas e biológicas do ambiente (FERNANDEZ, 2001).

Há uma técnica de monitoramento biológico onde escolhe uma espécie que não ocorra no local e que já saiba ser uma espécie sensível ao contaminante seja inserida no local desejado para que possa ser cultivada e feitas análises posteriores para ver se houve algum efeito de contaminação, essa técnica é chamada de transplantes de espécies. (FERNANDEZ, 2001). As espécies de ostras são as mais escolhidas para esta técnica, visto que seu cultivo é de fácil manutenção (FERNANDEZ, 2001).

O monitoramento de contaminação de compostos organoestânicos mais comuns utilizados são o imposex, o *bailing* e o intersex, sendo abordagens biológicas, mas havendo a oportunidade de se combinar esses monitoramentos ajuda a manter um monitoramento mais eficaz (EVANS et al., 1998; PEDRUZZI, 2009).

2.8.1.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando *Bailing*

Explica-se o *bailing* como uma anomalia e deformações na concha de bivalves, onde o cálcio não é devidamente depositado, causando assim deformações em sua concha, devido a modificações nas proteínas responsabilizadas na calcificação da concha, sendo primeiramente descrito em *Crassostrea gigas* na Baía de Archacon em 1970 (ALZIEU, 1986).

2.8.1.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Imposex

O imposex é a ferramenta mais utilizada, por ter uma ocorrência em muitas espécies, dando a possibilidade de ser estudada em vários locais do mundo, como na França com a espécie *Ocenebrina aciculata* (OEHLMANN et al., 1996), na Espanha pela espécie *Bolinus brandaris* (MORCILLO; PORTE, 2002), em Malta no Mediterrâneo pela espécie *Hexaplex trunculus* (AXIAK et al., 1995) e no Japão através da *Thais clavigera* (HORIGUSHI et al., 1998).

Áreas que possuem elevados índices de imposex (I%) indicam que provavelmente 100% das fêmeas podem estar atingidas tanto em estágios avançados quanto iniciais, e indicam áreas contaminadas severamente pelo TBT (GIBBS et al., 1994).

Os Neogastropoda tem mostrado através de pesquisas serem os mais afetados pela contaminação das tintas antiincrustantes à base de TBT. A perda desse grupo em ambientes contaminados tem indicado que a causa das mortes tem sido culpa da contaminação pelo TBT (ROACH; WILSON, 2009).

As análises de imposex mais usadas atualmente acabam utilizando um número muito grande indivíduos, passando de centenas exemplares coletados de uma mesma população, e esses animais não voltam para o ambiente, pois são sacrificados (CASTRO et al., 2007; LEMGHICH;BENAJIBA, 2007). Para impedir essa perda imensa toda vez que houver uma pesquisa nos locais estudados desenvolveu-se técnicas capazes de analisar os animais e mantê-los vivos, chamadas metodologias não destrutivas (FERNANDEZ et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2006).

2.8.1.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando intersex

O intersex é semelhante ao imposex em alguns aspectos, porém além da formação de um vaso deferente e um pênis na fêmea, o intersex causa uma mutação no oviduto palial, o transformando em uma próstata não-funcional (BAUER et al., 1995; OEHLMANN et al., 1998; VAN DEN BROECK et al., 2009).

O intersex foi descrito para a espécie *Littorina Littorea* (Linnaeus, 1758), usada para detectar ambientes contaminados por TBT (BAUER et al., 1995). A anormalidade nesta espécie é presente apenas quando a contaminação do ambiente chega a superar 15ng TBTL^{-1} , e apenas os indivíduos juvenis ou imaturos sexualmente apresentam essa anormalidade (BAUER et al., 1997).

Essa análise se torna eficaz em ambientes contaminados devido sua sensibilidade ser um pouco maior que a maioria das outras espécies (OEHLMANN et al., 1998).

Bauer e outros (1995) e Oehlmann e outros (1998) descreveram o intersex em cinco estágios. O primeiro estágio denominado de 0 compreende as fêmeas saudáveis. O estágio 1 ocorre um aumento na abertura genital da fêmea por uma fenda proximal, e sua bursa copulatrix se divide ventralmente. No terceiro estágio, chamado de estágio 2, o oviduto palial se divide ventralmente, expondo os lobos internos, começando já a apresentar características masculinas, já que a próstata nos machos possui um sulco aberto. O estágio 3 compreende com a suplantação das glândulas do oviduto palial por uma glândula da próstata. No estágio 4 a fêmea já apresenta o pênis e seu sulco seminal sem apresentarem espermiogênese.

Do segundo estágio ao quarto, ocorre uma má formação morfológica do oviduto da fêmea, causando uma inibição da cápsula fazendo com que as fêmeas se tornem estéreis (BAUER et al., 1995).

O parâmetro usado para a quantificação de intersex nas populações é o índice de intersex (IS) onde é calculado como valor médio de estágios de intersex em uma amostra (BAUER et al., 1995).

O imposex e o intersex possuem muitas semelhanças, sendo possível sua comparação. Dependendo da quantidade de TBT em que os indivíduos são expostos, as respostas no desenvolvimento das síndromes podem variar, podendo então avaliar o nível de contaminação em comparação com o nível de imposex ou intersex encontrado nos indivíduos (BARROSO et al., 2000).

Apesar de serem parecidas, as duas síndromes possuem suas singularidades. No imposex por exemplo a fêmea não perde seu sistema genital, mas sim o sistema genital masculino se sobrepõe, por isso o nome se remete a imposição sexual. No intersex pelo contrário, os órgãos femininos são modificados e suplantados por órgãos masculinos correspondentes (BAUER et al., 1995; OEHLMANN et al., 1998; SUNDERMANN et al., 1998).

2.8.2 Monitoramento Químico

O monitoramento químico possui um custo alto, e demanda de um trabalho complexo, já que são necessárias muitas análises que devem ser feitas rapidamente. Como a água é o primeiro meio a ser contaminado pelo TBT por estar diretamente em contato com os cascos de navios e ser um meio extremamente energético, recebe várias influências, como o tempo exposto, fenômenos temporais, a variação da maré, etc. Desse modo é preciso muitas amostras e análises para se chegar a um número preciso da concentração encontrada no meio (FERNANDEZ, 2001).

2.8.2.1 Técnicas Bioindicadoras utilizando Água

Pesquisas já mostraram que o TBT ao longo da coluna d'água demonstrou sua degradação, formando um derivado de TBT, o dibutilestanho (FERNANDEZ, 2001). A degradação do TBT ao dibutilestanho precisa de uma energia necessária de 190-220kJ/mol. O comprimento de onda da luz ultravioleta chegando a 290nm com uma energia de 300kJ/mol é o suficiente para que desencadeie a degradação do composto (WHO, 1990)

Experimentos foram feitos em como o TBT se comporta em meio de água destilada contaminada com incidência de luz e observou-se que a fotólise em luz natural foi limitada, resultando meia vida de TBT durante três meses de experimento, e quando

aumentou a luz do experimento para uma luz de intensidade de 300nm, a degradação reduziu a meia vida do TBT em um dia de experimento (WHO, 1990).

Para que o monitoramento biológico através de análise de água é complicado pois possui muitos problemas que precisam ser compensados na hora de detectar o contaminante, é necessário fazer muitas análises extensivas levando em consideração muitas variáveis para que possa chegar em um número preciso mesmo que em termos de matriz não há muitos problemas (FERNANDEZ, 2001).

2.8.2.2 Técnicas Bioindicadoras utilizando Sedimento

Langston e Pope (1995) observaram que após serem liberados na água, os compostos organoestânicos são absorvidos nos sedimentos. Estudos em sedimentos contaminados por organoestânicos mostraram que indivíduos que são contaminados pelo TBT através do sedimento apresentam um efeito rápido ao serem comparados com os expostos à coluna d'água (BARTLETT et al., 2004) já que a concentração no sedimento é maior. O TBT no sedimento é capaz de ser datado e aferir sua intensidade a partir da sua distribuição vertical, podendo até estimar sua variação na deposição no ambiente (FORSTNER; SALOMONS, 1984).

As análises de sedimento são muito complexas pois como a disponibilidade de matéria orgânica é um controlador dos compostos organoestânicos, elas possuem muitas variáveis assim como as análises de água, além de sofrerem interferência com outros compostos, demandando uma quantidade de amostras muito grande para que possa gerar resultados significativos e precisos (LANGSTON; POPE, 1995).

2.8.2.3 Técnicas Bioindicadoras utilizando Material Biológico

A bioacumulação nos ambientes é bem alta devido a presença da fauna e flora, o que permite usa-la para bioindicação em locais contaminados. Como os compostos organoestânicos variam muito com o tempo, a bioacumulação se torna um método eficaz ao analisar temporalmente a concentração de TBT no ambiente (FERNANDEZ, 2001).

Apesar de sua eficácia ao ser analisada, a eficácia da bioacumulação como bioindicador se destaca ao se relacionar com outras análise como associação química e física (AUSTEN; MCEVOY, 1997; GIBBS; BRYAN, 1994) , pois os organismos se relacionam com a distancia das fontes de contaminação, onde maior a distancia, menor a bioacumulação (BURT; EBELL, 1995; KAN- ATIREKLAP et al., 1997)

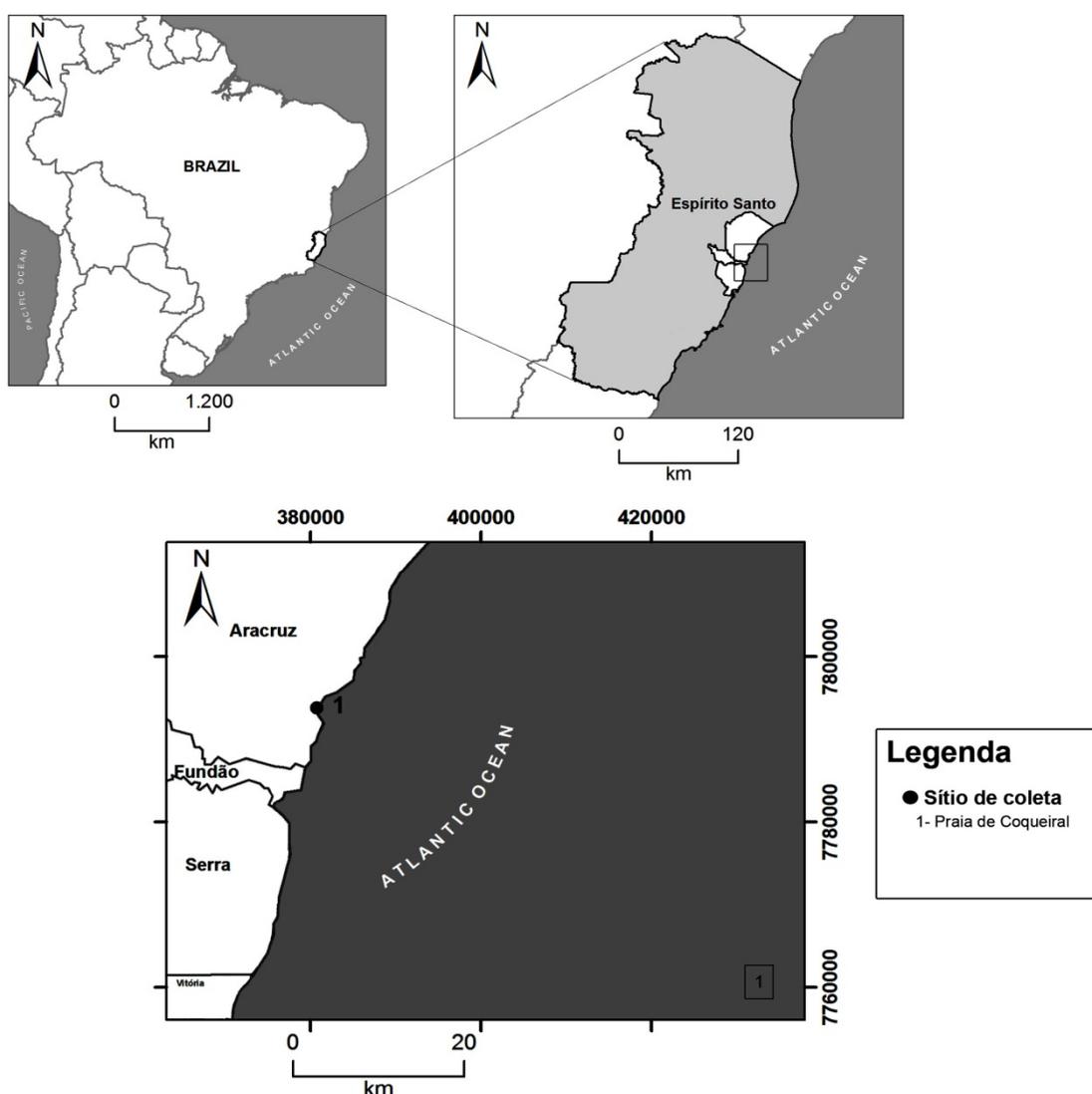
Este método tem a sua eficácia comprovada, mas a sua dificuldade para alcançar estes resultados está na falta de equipamentos biológicos capazes de reagir às contaminações para que possa se comparar ao método químico (FERNANDEZ, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA AMOSTRAL

Espécimes de *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Gastropoda: Muricidae) foram coletados em fevereiro de 2013 no sítio de amostragem localizado na Praia de Coqueiral, sendo localizado no município de Aracruz, Espírito Santo, Brasil (-19° 56' 37.54", -40° 8' 39.67") (Figura 5). Estudos preliminares demonstraram a ausência de indivíduos contaminados, concluindo serem áreas amostrais livres de contaminação por TBT, garantindo a presença de apenas animais saudáveis (COSTA, 2012).

Figura 5 – Localização do ponto amostral no litoral norte do Espírito Santo. (1) Praia de Coqueiral



Fonte: Adaptado de Costa, 2012.

3.2 ESCOLHA DA ESPÉCIE

Stramonita haemastoma (Linnaeus, 1767) mostrou ser uma boa espécie bioindicadora da poluição por TBT na costa do Espírito Santo, por ser uma espécie sensível à exposição crônica ao poluente e por ter uma vasta distribuição em toda a costa brasileira. (LIMAVERDE *et al.*, 2007).

Figura 6 – Exemplar da espécie *Stramonita haemastoma*.



Fonte: Elaboração própria

A espécie tem ocorrência em áreas tropicais e águas temperadas, podendo ser encontrada em América do Norte e no litoral brasileiro se associando em costões rochosos. (RIOS, 1994).

3.3 EXPERIMENTO EM LABORATÓRIO

Para a realização deste trabalho, fêmeas juvenis e adultas foram utilizadas. Os indivíduos coletados foram levados para o laboratório da Base Oceanográfica da Universidade Federal do Espírito Santo, narcotizados em uma solução 1:1 de Cloreto de Magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 4%, industrializado por VETEC QUÍMICA FINA LTDA, em água destilada e água do mar do local de coleta. A sexagem foi feita puxando gentilmente o opérculo do animal até que seja possível a

visualização da entrada da cavidade palial, podendo-se verificar a presença ou ausência do pênis e vaso deferente. Após a seleção das fêmeas, os machos foram devolvidos ao local de coleta, e as mesmas foram aclimatados por duas semanas antes do início do experimento.

Um total de 100 fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em 5 aquários de plástico (Figura 7), com 20L de água cada, sob salinidade 32 ± 1 e mantidos a uma temperatura de $25^{\circ} \pm 2$, oxigenados permanentemente, e expostos a um fotoperíodo natural (12:12, claro:escuro). A água utilizada nos aquários foi obtida na Base Oceanográfica da Universidade Federal do Espírito Santo, sendo esta coletada na Praia de Coqueiral – Aracruz/ES por meio de bomba de captação, filtrada e exposta a radiação UV.

Figura 7 – Disposição dos aquários em laboratório.



Fonte: Elaboração própria

Desses 5 aquários, 4 receberam água contaminada, sendo 2 para concentração de 5ng TBTL⁻¹ separando um aquário para jovens e um para adultos, e 2 com concentração de 50ng TBTL⁻¹ havendo a mesma separação, e um aquário serviu de controle. Foram distribuídas em cada aquário 20 fêmeas.

A separação para aquários réplicas não foi possível devido ao número de exemplares encontrado em campo ser muito limitado, em apenas 3 dias de coletas foram obtidos apenas 106 fêmeas dos 223 espécimes coletados.

A indução de imposex se deu pela exposição dos animais à água contaminada por TBT. Para tal, foi utilizada uma solução de 500µg L⁻¹. Os tratamentos estabelecidos seguiram a metodologia utilizada por Abidli *et al.*, (2012) adotando os valores de 5ng TBTL⁻¹ e 50ng TBTL⁻¹. Obedecendo ao período semanal de manutenção dos aquários, os animais foram alimentados com *Tegula viridula* (Gmelin, 1791) (Gastropoda: Trochidae) coletados na Praia de Coqueiral e os aquários tiveram a água renovada e recontaminada.

3.4 ANÁLISE DE IMPOSEX

Ao decorrer de cada quinzena de exposição ao experimento, 20 animais foram escolhidos aleatoriamente dos aquários, seguindo a ordem de cinco animais por aquário. A análise de imposex foi feita através do método tradicional, no qual os animais foram narcotizados, da mesma forma supracitada, desconchados com auxílio de uma morsa para a exposição das partes moles e microscópio estereoscópico para visualização das partes pequenas.

Para determinar os diferentes níveis de imposex foram utilizados os seguintes indicadores: I% (percentagem de fêmeas imposexadas), proposto por Gibbs & Bryan (1987), VDSI (índice da sequência do vaso deferente), o Comprimento do pênis da fêmea (CPF) e a escala de seis estágios proposta por Gibbs & Bryan (1994) e adaptada por Fernandez *et al.* (2005). Nessa escala, o estágio 0 é atribuído a fêmeas normais. O estágio I inclui fêmeas apresentando uma pequena protuberância ou pré-pênis atrás do tentáculo direito. No estágio II, um pequeno pênis é visível. No estágio III, o pênis é um pouco maior e um vaso deferente incompleto pode ser observado no teto da cavidade palial. No estágio IV, o vaso deferente está completo, e o pênis da fêmea atinge um tamanho maior do que metade do tamanho médio do macho. O estágio V é caracterizado pela vulva

bloqueada e o estágio VI, pela presença de uma massa de ovos na glândula da cápsula.

Para verificar a condição da vulva, se aberta ou fechada, seguindo a metodologia utilizada por Pedruzzi (2009), foi utilizado um alfinete entomológico Nylon Heads Papillon Nº 00, o qual foi introduzido no poro gonodal das fêmeas, permitindo uma melhor observação da sua condição.

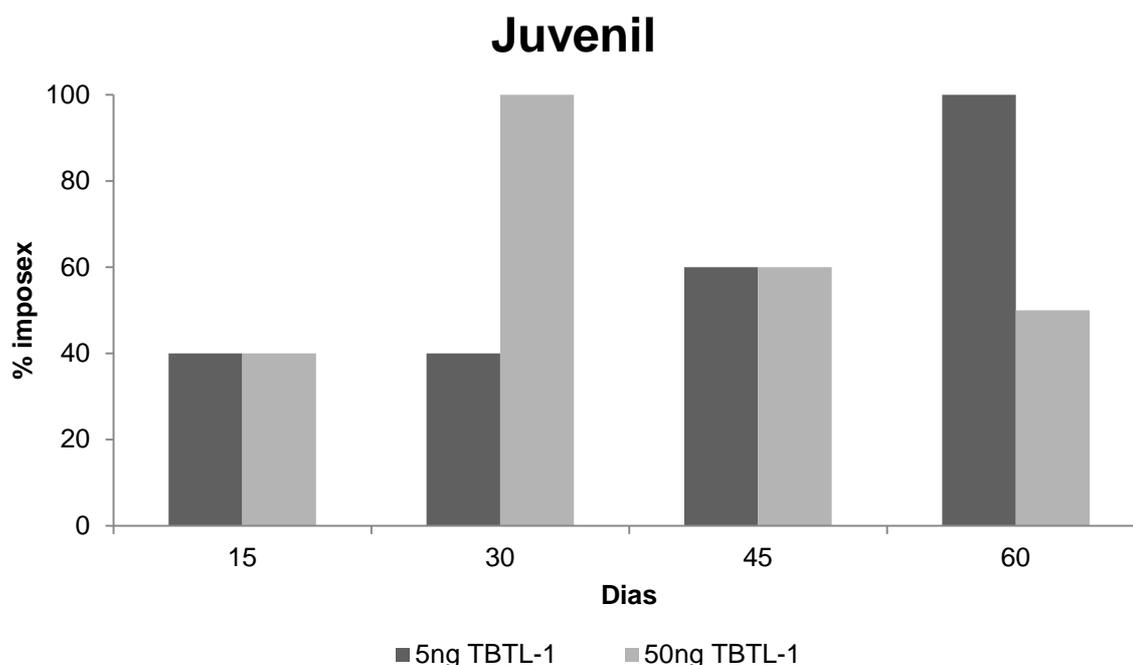
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste Anova para dados paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos com auxílio do programa Statistica 8.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 IMPOSEX

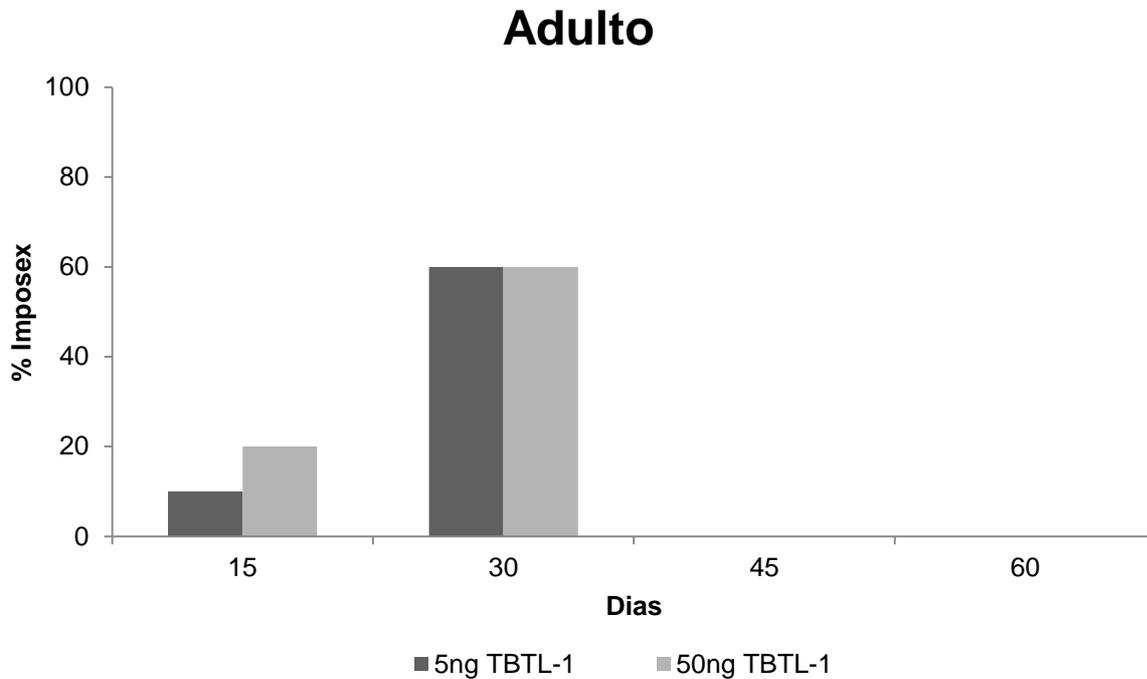
Gráfico 1- Porcentagem de Imposex (I%) obtidos para indivíduos jovens em relação ao tempo de exposição a duas concentrações de TBT.



Fonte: Elaboração Própria

O gráfico 2 mostra a porcentagem de Imposex (I%) em relação ao tempo de exposição para os exemplares juvenis. Com 15 dias de tratamento pode-se observar a presença de exemplares imposexados, com 40% dos indivíduos imposexados em ambas as concentrações. Na análise de 30 dias pode-se perceber um aumento na porcentagem para 100% de imposex dos animais analisados na concentração de 50ng TBT/L⁻¹, e na concentração de 5ng a porcentagem permaneceu em 40%. Nas análises de 45 dias pode se observar um aumento no I% para 60% dos animais analisados na concentração de 5ng TBT/L⁻¹, enquanto na concentração de 50ng TBT/L⁻¹ houve uma queda para 60% de imposex dos animais analisados. Já na análise de 60 dias pode se observar novamente um aumento do I% na concentração de 5ng/L⁻¹ para 100% dos animais analisados enquanto na concentração de 5ng TBT/L⁻¹ houve uma redução para 50% de imposex dos animais analisados.

Gráfico 2 – Porcentagem de Imposex (I%) obtidos para indivíduos adultos em relação ao tempo de exposição a duas concentrações de TBT.



Fonte: Elaboração Própria

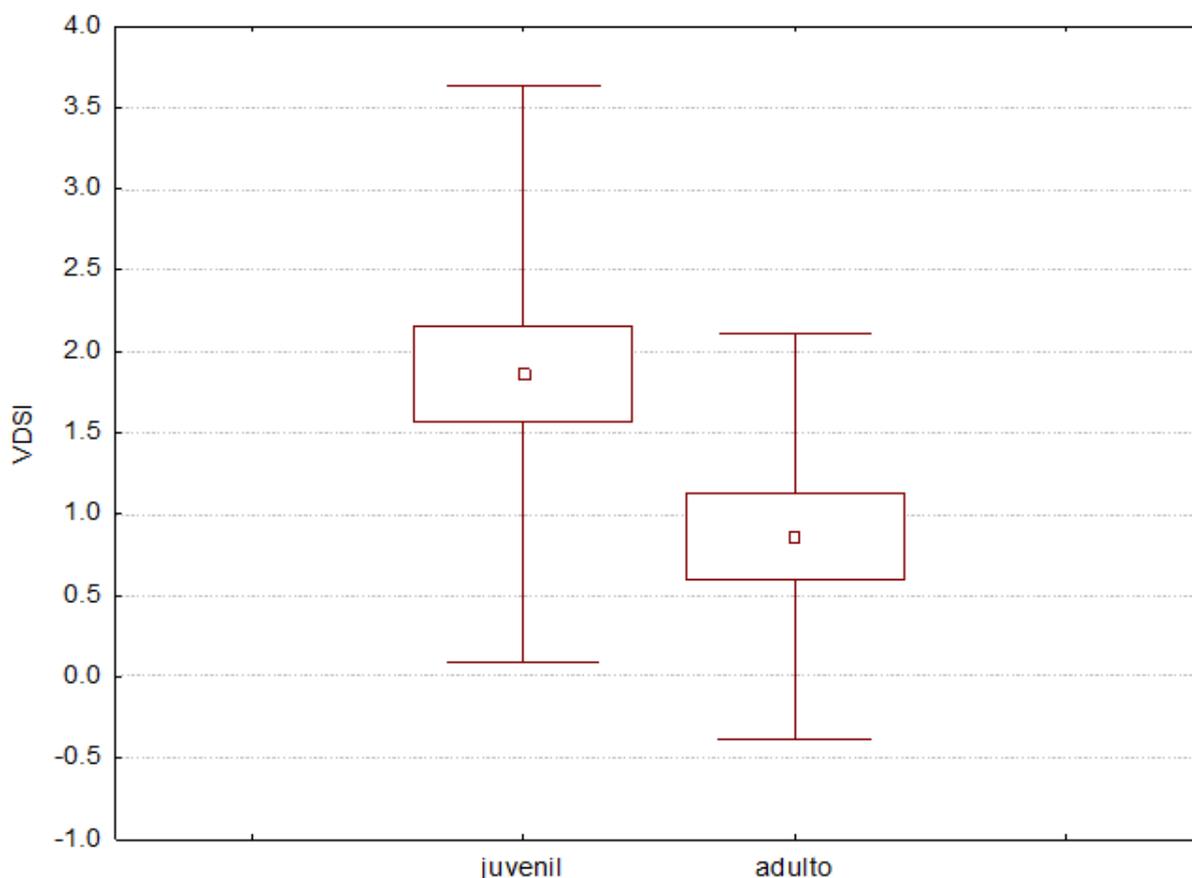
Observa-se no gráfico 2 a porcentagem de imposex nos indivíduos adultos em relação ao tempo de exposição às concentrações 5ng TBT/L⁻¹ e 50ng TBT/L⁻¹. Pode-se observar na primeira análise de 15 dias a presença de 10% de imposex dos indivíduos analisados na concentração de 5ng/L-1 e 20% dos indivíduos imposexados na concentração de 50ng TBT/L⁻¹. Na segunda análise, de 30 dias, pode-se observar um aumento nos indivíduos imposexados para 60% em ambas as concentrações. Nas análises de 45 e 60 dias não houve resultado suficiente pois devido a morte dos animais durante o experimento ele teve de ser encerrado.

Para os indivíduos que estiveram exposto apenas à água do mar no aquário controle o índice de porcentagem de imposex se manteve em zero (fêmeas saudáveis) em todos os intervalos de tempo.

4.2 NÍVEIS DE VDSI

Nos exemplares jovens a média de VDSI permaneceu entre 2 e 1,5 dentre toda as análises, tendo uma média do desvio padrão entre 0 e 3,5.

Gráfico 3 – Média de VDSI em relação às classes de tamanho Juvenil e Adulto



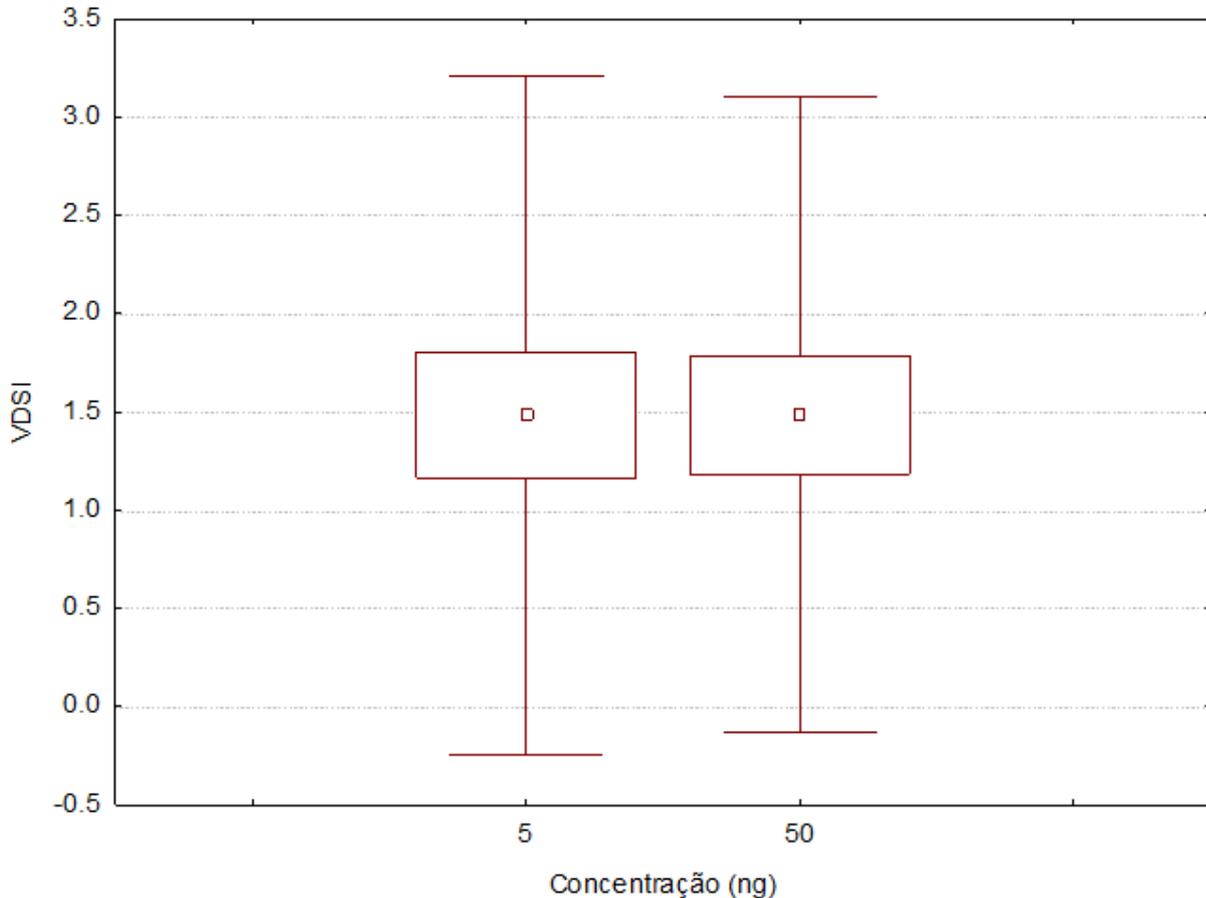
Fonte: Elaboração Própria

A média nos exemplares adultos permaneceu entre 0,5 e 1 tendo um desvio padrão entre 0,5 e 2. A média de VDSI em relação aos jovens e adultos, segundo o teste de Kruskal-Wallis, foi significativo tendo um valor de $P=0,03$, o valor do teste foi de 4.54 comprovando que os jovens são mais sensíveis ao tratamento com TBT.

Na concentração de 5ng TBT/L^{-1} o valor máximo de VDSI encontrado foi de 5 e o valor mínimo foi 2 enquanto na concentração de 50ng TBT/L^{-1} o valor máximo foi de 4 e o mínimo também 2. Os níveis de VDSI em relação à concentração de TBT/L^{-1} não apresentaram diferença significativa quando analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. É possível ver também que os níveis permaneceram na mesma faixa tanto na concentração de 5ng TBT/L^{-1} e 50ng TBT/L^{-1} permanecendo em uma média de 1,5.

Os níveis de VDSI como observado no gráfico 5 teve um aumento gradativo em relação ao tempo de exposição.

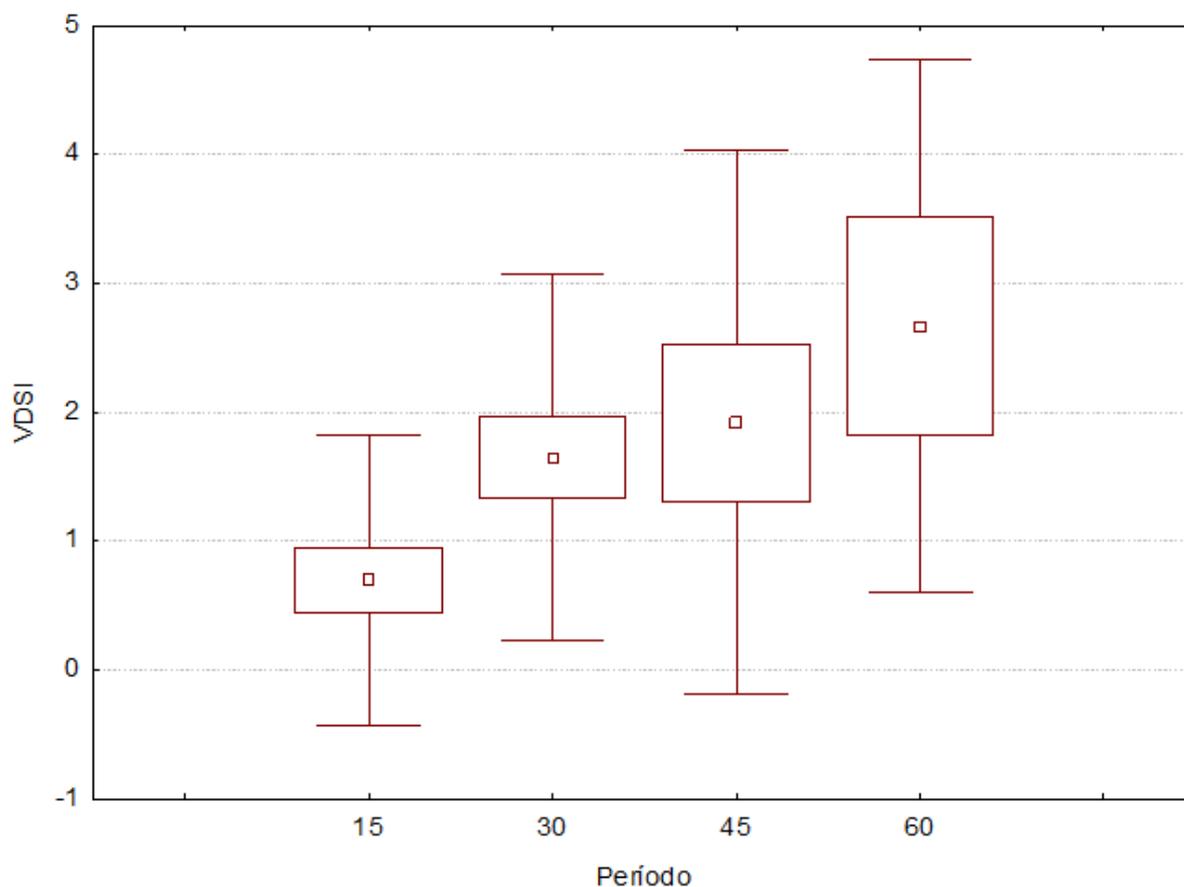
Gráfico 4 – Níveis médios de VDSI em relação à concentração de TBT/L-1.



Fonte: Elaboração Própria

Na análise de 15 dias os valores médios de VDSI se mantiveram numa faixa próximo a 1. Na análise de 30 dias observa-se um aumento, com valor médio próximo a 2. A média do nível de VDSI na análise de 45 dias teve um aumento também se mantendo mais perto de 2 em relação à análise anterior. Na análise de 60 dias de exposição exibiram uma média de VDSI maior com valor aproximado de 3.

Gráfico 5 – Níveis de VDSI em relação ao períodos expostos: 15 = 15 dias, 30= 30 dias, 45= 45 dias, 60= 60 dias.



Fonte: Elaboração Própria

4.3 COMPRIMENTO DO PENIS DA FÊMEA (CPF)

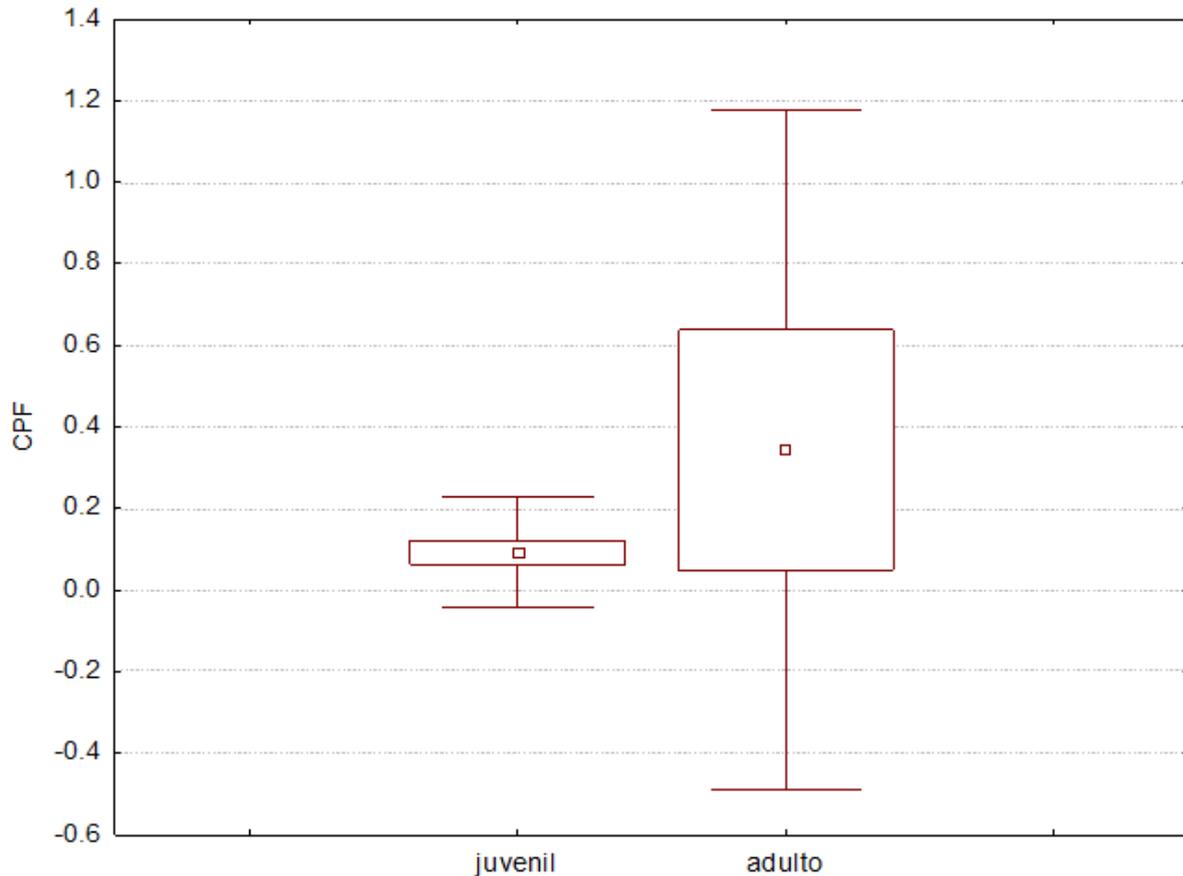
Nos exemplares juvenis o comprimento do penis de fêmea (CPF) maior encontrado foi no valor de 0,5 cm e o menor valor foi de 0,05 cm. Nos exemplares adultos o maior valor foi de 2,4 cm e o menor valor também foi de 0,05 cm. O comprimento do penis da fêmea (CPF) não teve diferenças ao ser submetido ao teste de kruskal wallis . O C.P.F juvenis se mantiveram numa média entre 0 e 0,2 enquanto nos exemplares adultos o C.P.F esteve em uma média de 0,2 e 0,4 como pode ser visto no gráfico 6.

O comprimento do pênis da fêmea (CPF) teve uma média entre 0,2 e 0,4 na concentração de 5ng TBT/L⁻¹ como pode ser observado no gráfico 7, enquanto na concentração de 50ng TBT/L⁻¹ a média permaneceu próximo de 0.

No gráfico 8 pode ser observado um aumento no comprimento do pênis da fêmea após 30 dias de exposição ao contaminante em relação à exposição por 15 dias,

porém nas análises das exposições em 45 e 60 os resultados se mativeram perto de 0 pois os valores de CPF se mativeram apenas em 0,05cm.

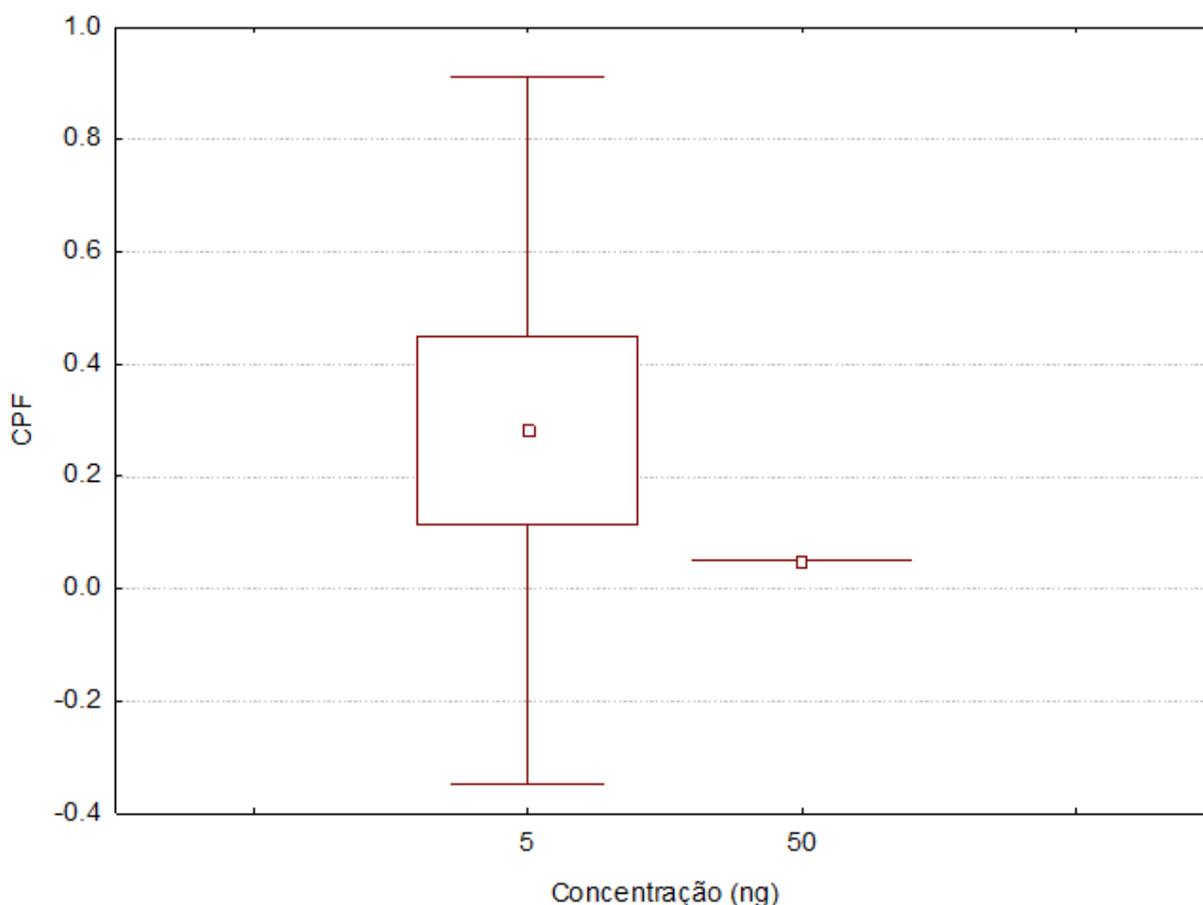
Gráfico 6 – Comprimento do pênis da fêmea (CPF) em relação às classes de tamanho Juvenil e Adulto.



Fonte: Elaboração Própria

Os dados obtidos neste estudo correlacionando as porcentagens de imposex (1%) com o tempo exposto mostrou um gradativo aumento para os indivíduos juvenis, tendo em vista que nas primeiras análises os resultados foram baixos (40% em cada concentração) em relação às outras análises, como na segunda análise de 30 dias onde o valor na concentração de 50ng TBT/L⁻¹ alcançou 100% dos exemplares imposexados.

Gráfico 7 – Comprimento do Pênis de Fêmea (CPF) em relação á concentração exposta 5 = 5ng TBT/L⁻¹, 50 = 50ng TBT/L⁻¹

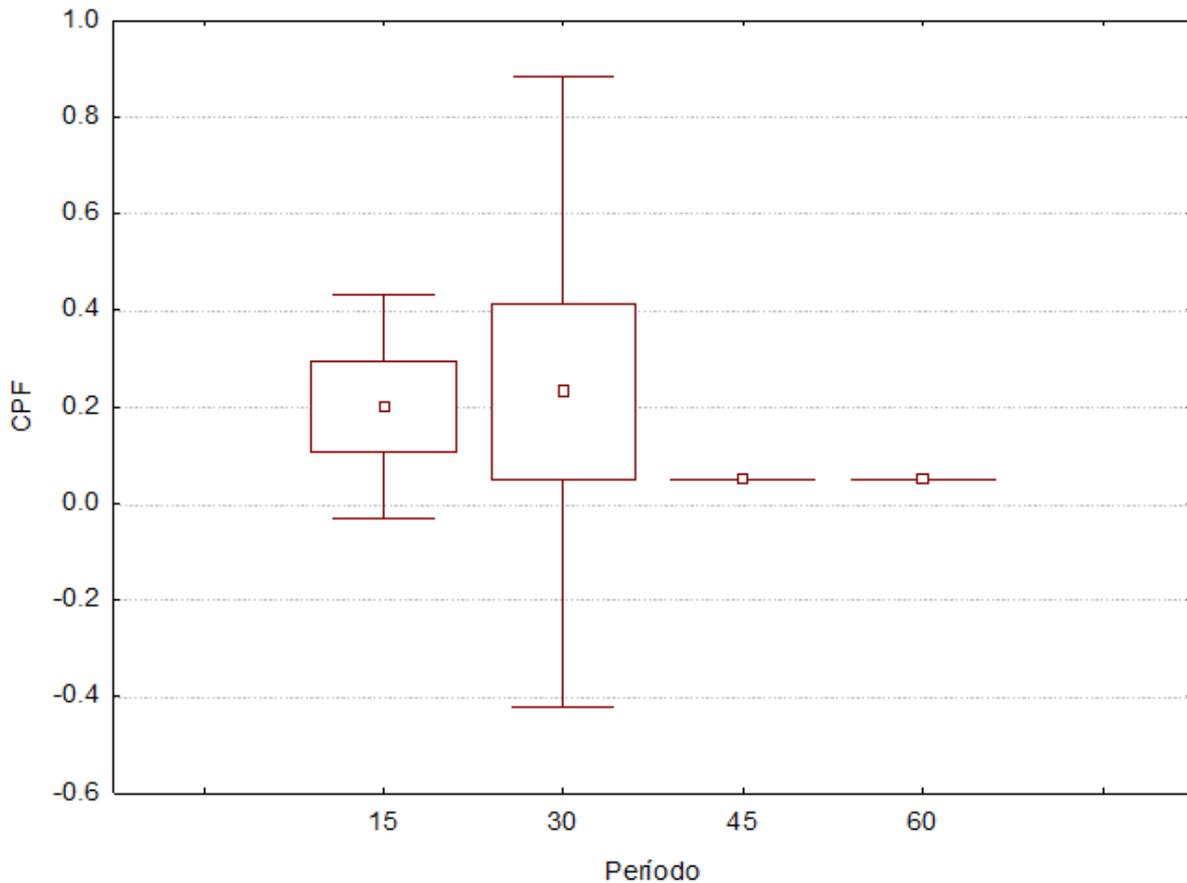


Fonte: Elaboração Própria

Porém na concentração de 5ng TBT/L⁻¹ se manteve em 40% imposexados. Provavelmente a concentração de 50ng TBT/L⁻¹ tenha sido muito alta para os exemplares alcançarem o total de imposexados em um intervalo de tempo tão curto, enquanto a concentração de 5ng TBT/L⁻¹ não foi o suficiente. Como pode ser visto na concentração de 5ng TBT/L⁻¹ nas análises de 45 dias onde continua aumentando (60% de imposexados) mas na concentração maior (50ng TBT/L⁻¹), a porcentagem diminuiu para 60% . O aumento do I% em ambas as concentrações era esperado, porém houve o contrário na maior concentração (50ng TBT/L⁻¹), o problema pode ser explicado pelo número de exemplares escolhidos para cada análise (5 exemplares) não ter sido o suficiente para exemplificar o objetivo do estudo.

O baixo número de exemplares para cada análise pode ser explicado pela dificuldade de se encontrar espécimes em campo, totalizando em apenas 106 fêmeas dos 223 espécimes coletados em 3 dias de coletas.

Gráfico 8 – Comprimento do penis da fêmea (CPF) em relação ao período exposto ao contaminante TBT onde exemplares de 45 e 60 dias apresentaram apenas pênis no tamanho de 0,05cm.



Fonte: Elaboração Própria

Nas análises de 60 dias pode-se ver um aumento para 100% dos exemplares imosexados na concentração de 5ng TBT/L⁻¹, o que era de se esperar já que partimos da hipótese de que quanto maior for o tempo exposto, maior seria a porcentagem de exemplares imosexados, como podemos ver também em um trabalho de Abidli, A. et al. (2012) onde obteve resultados semelhantes para outras espécies estudadas. Porém na concentração de 50ng TBT/L⁻¹ houve novamente uma diminuição (50% de imosex), o que entra em conflito com a hipótese. A redução de 1% neste caso, pode ter sido acarretado devido a perda de exemplares para esta análise, já que foi possível analisar apenas 3 exemplares de cada concentração, causando um aumento na concentração de 5ng TBT/L⁻¹ e uma diminuição na concentração de 50 TBT/L⁻¹.

Em indivíduos adultos houve um crescimento gradativo na porcentagem de Imposex (I%), na primeira análise da concentração de 5ng TBT/L⁻¹ apenas 10% dos indivíduos foi imposexados enquanto na concentração de 50ng TBT/L⁻¹ 20% dos exemplares foram imposexados. Comprovando que nas maiores concentrações deve-se obter o maior valor de indivíduos imposexados, devido sua maior concentração como também foi encontrado em outros trabalhos como no de Abidli et al. (2012). Na segunda análise de 30 dias, em ambas as concentrações obtiveram um valor de 60% dos exemplares imposexados. Um aumento esperado comprovado pela análise, já que como dito anteriormente: quanto maior for o tempo exposto, maior será encontrado o valor de I%. Nas outras análises não obtive valores suficientes devido à grande perda nos exemplares adultos, tendo apenas um exemplar para análise de 45 dias em ambas as concentrações, e nenhum exemplar para a análise de 60 dias, tendo uma perda total de 9 espécimes em cada concentração. Não se tem nenhuma explicação concentra sobre o fato de haver uma perda maior em exemplares adultos em relação aos juvenis, mas provavelmente seria pelos adultos já estarem completamente formados e completamente desenvolvidos, estarem mais sensíveis a estresse á exposições de situações diversas, como novo habitat ou exposição a substancias toxicas, do que em exemplares jovens, que por estarem ainda em formação, devem ter uma tolerância maior à mudança de ambiente e exposições à toxicidades.

Os indivíduos da análise de Controle não obteve nenhum resultado diferente do esperado, em todas as análises houve 0% de imposex, ou seja, todos os exemplares estavam saudáveis. O que podemos mostrar nos resultados de que a área usada para coleta aparentemente está livre de concentrações que possam comprometer a população de *Stramonita haemastoma* da região.

Os níveis de VDSI em juvenis alcançaram valores maiores em relação em adultos, podendo alcançar valores de até 5, enquanto nos adultos o valor máximo encontrado foi 4 na análise de 30 dias. Pode ser que caso houvesse outras análises de intervalo de tempos maiores para indivíduos adultos talvez alcançaria resultados maiores, mas é normal o resultado em juvenis ter sido maior, devido sua classe de tamanho. Onde indivíduos adultos por já possuírem seu sistema reprodutor completamente desenvolvido são menos sensíveis ao contaminante em relação aos

jovens que ainda estão em formação, logo são mais sensíveis a mudanças. (MENSINK et al, 2002).

Quando correlacionado os níveis de VDSI em relação às concentrações submetidas, não obteve muita diferença, tendo um resultado de uma média de 1,5 para ambas as concentrações. Mostrando que o nível de VDSI para essa espécie independe do quanto um indivíduo é exposto ao contaminante, que apesar da quantidade ser um fator para a expressar o fenômeno imposex, uma vez imposexado a quantidade não influencia no nível de VDSI dos indivíduos.

Os níveis de VDSI quando relacionados ao tempo de exposição às concentrações de TBT, obteve um valor satisfatório, onde os menores valores se mativeram nas primeiras análises e foi crescendo de acordo com o andamento das análises posteriores. Isso mostrou evidentemente que o nível de VDSI aumenta em relação ao tempo exposto ao contaminante.

O comprimento de pênis da fêmea (CPF) em relação os juvenis obteve um valor médio menor comparado aos valores médios dos exemplares adultos, devido exclusivamente a um exemplar cujo tamanho do CPF foi de 2,4cm resultando em um aumento da média, enquanto os outros valores de CPF dos adultos permaneceu em 0,05cm. Nos indivíduos juvenis, a maioria dos valores permaneceu em 0,05cm também, mas dois exemplares obtiveram um CPF no tamanho de 0,5cm. Provavelmente os números de exemplares novamente não foi o suficiente para exemplificar os resultados esperados, uma média maior em exemplares juvenis em relação aos adultos.

Quando relacionado o CPF em relação as concentrações expostas, obteve uma média maior na concentração de 5ng TBT/L⁻¹, enquanto a média na concentração de 50ng TBT/L⁻¹ se manteve baixa perto de 0. A média maior pode ser explicado pelo exemplar adulto que obteve um CPF no valor de 2,5cm ter sido da concentração de 5nb TBT/L⁻¹ o que elevou a média acima da concentração de 50ng TBT/L⁻¹. Excluindo este exemplar, a média nas duas concentrações permanece a mesma, aferindo então que a concentração não influencia no CPF assim como o VDSI.

A média do CPF quando relacionado aos tempos de exposição, pode-se de observar um aumento esperado comparando a segunda análise em relação à primeira, mas quando comparado às análises de 45 e 60 dias, a média do CPF diminui para quase

0. Isso se deve pelo valor dos CPF nessas análises atingirem valor apenas de 0,05cm, enquanto nas outras análises tiveram valores de 0,5cm e até 2,4cm. Toste et al (2013) observou em seu trabalho várias rotas possíveis na formação de um vaso deferente, onde em seu trabalho pode observar rotas em que há a formação de um vaso deferente sem a formação de um pênis e uma hipótese de que o desenvolvimento do imposex começa com a formação de um vaso deferente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados adquiridos neste estudo, pode-se observar um aumento gradativo na porcentagem de imposex em fêmeas da espécie *Stramonita haemastoma* de acordo com a metodologia aplicada, o que também foi observado em outras espécies por outros autores.

A espécie mostrou ser bem sensível ao contaminante apresentando índices de imposex com poucos dias de exposição em concentrações baixas e um desenvolvimento bem expressivo do vaso deferente durante todo o experimento apesar de não desenvolver completamente um pênis.

Por ser uma espécie que se encontra distribuída em praticamente toda a costa brasileira, se torna uma boa candidata como bioindicadora de áreas contaminadas por TBT, porém não podemos concluir que essa espécie possa ser sensível à outros contaminantes encontrados em portos e marinas.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A.; ABEL, P.D.; ARNOLD, D.W.; MILNE, A. Cost-benefit analysis of the use of TBT: the case for a treatment approach. **The Science of the Total Environment**. v. 258, p. 5-19, 2000.
- ABIDLI, S.; SANTOS, M.M; LAHBIB, Y.; CASTRO, L.F.C; REIS-HENRIQUES, M.A.; MENIF, N.T.E. Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): Imposex induction and sex hormone levels insights. **Ecological Indicators**. v. 13, p. 13-21, 2012.
- ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **The Science of the Total Environment**. v. 258, p. 99-102, 2000.
- 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.
- ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**. v.40. p.23-36,1998.
- ANTIZAR-LADISLAO, B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**. v. 34, p. 292–308, 2008.
- ARAÚJO, M. L. R.; ROCHA-BARREIRA, C. A. Distribuição espacial de *Anomalocardia brasiliensis* (GMELIN, 1791) (MOLLUSCA, BIVALVIA, VENERIDAE) na Praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. **Boletim Técnico-Científico do CPENE**, Recife. v. 12, n. 1, p. 11-21, 2004.
- AUSTEN, M.C. AND MC EVOY, A.J. Experimental Effects of Tributyltin (TBT) Contaminated Sediment on a Range of Meiobenthic Communities. **Environmental Pollution**. v.96, n.3, p.435-444, 1997.
- AXIAK, V.; VELLA, A. J.; MICALLEF, D.; CHIRCOP, P.; MINTOFF, B. Imposex in *Hexaplex trunculus*(Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. **Marine Biology**. v.121, p. 685-691, 1995.
- 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 Environment**. v. 258, 89-97, 2000.

AZENHA, M.; VASCONCELOS, M.T.; Butyltin compounds in Portuguese wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2713-2716, 2002.

BAALS, P.W. Tributyltin (TBT) in the waters of a Scottish Sea Loch Arising from the use of antifoulant treated netting by salmon farms. **Aquaculture**. v. 65, 1987.

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

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

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

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

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. **Hydrobiology**. 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, 299-309, 1997.

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

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

BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Ecologia Populacional de *Anomalocardia brasiliana* (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. Diretoria de Portos e Costas. **Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas anti-incrustantes danosos em embarcações**. Brasil, 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.

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

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

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.

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

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

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

CASTRO, I.B.; RODRIGUES-QUEIROZ, L.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha – uma revisão. **Arquivos de Ciência do Mar**. v. 40, p. 96-112, 2007.

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

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

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.

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.

CONAMA 357/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> Acessado em: 20 de maio de 2013.

COSTA, M.B. **Avaliação da contaminação por compostos organoestânicos (COEs) no litoral do Espírito Santo por meio de indicadores biológicos, imposex e intersex: uma análise espacial e temporal**. Tese (Doutorado em Oceanografia Ambiental) – Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

- CRESSWELL, T. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal Waters. **Marine Pollution Bulletin**. v.52. p.1169-1175, 2006.
- DAFFORN, K.A.; LEWIS, J. A.; JOHNSTON, E. L. Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p – 453-465. 2011.
- 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.
- DEPA. Fact Sheet No. 24: Antifouling Bottom Paint. Danish Environmental Protection Agency. Ministry of the Environment, Kobenhavn, Denmark.
- 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.
- ELLIS, D.V. E PATTISINA, L.A. Widespread Neogastropod Imposex: A Biological Indicator of Global TBT Contamination. **Marine Pollution Bulletin**. v. 21, n. 5, p. 248-253, 1990.
- EVANS, S.M. NICHOLSON, G.J. BROWING, C. HARDMAN, E.; SELIGMAN, O. SMITH, R. An assessment of tributyltin contamination in the North Atlantic using 86 imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* as a biological indicator of TBT pollution. **Invertebrate Reproduction and Development**. v.34. p. 227-287, 1998.
- 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. 204-211. 2000.
- 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. 239-252. 2003.
- FERNANDEZ, M. A. Brazilian Experience on TBT Pollution: Lessons For Future Studies. **Journal of Coastal Research**. SI 39. 2004.
- FERNANDEZ, M. A.; LIMAVERDE, A. M.; CASTRO, I. B.; ALMEIDA, A. C. M.; WAGENER, A. L. R. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible

evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 463-476, 2003

FERNANDEZ, M.A.; GEBARA, L.; TELLES, G.; BISPO, L.; WAGENER, A.R. **Imposex in Thais (Stramonita) haemastoma na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro: Possível impacto do uso de tiibutilestanho como anti-incrustante**. 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, Anais, p.45. Itajaí: Centro de Educação Superior em Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade Vale do Itajaí. 1998.

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**. vol.53 n.1-2 São Paulo, 2006.

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

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

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.

GIBBS, P.E., BRYAN, G.W. Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod mollusks. **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**. v.54, p. 205–226, 1994

GIBBS, P.E., BRYAN, G.W. TBT paints and demise of dog-whelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda). **Proceedings the Oceans – An International Workplace Conference**, vol. 4, p. 1482–1487, 1987

GIBBS, P.E.; BEBIANO, M.J; COELHO, M.R. Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution with notes on a species (*Collumbella*

rústica) lacking the imposex response. **Environmental Technology**. v.1, n. 1219-1224, 1997.

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

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

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P.L. TBT-Induced imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus*: geographical uniformity of the response and effects. **Marine Environmental Research**. v. 32, p. 79-87, 1991.

GODOI, A.F.L.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por Compostos Organoestânicos. **Química Nova**, v.26, p.708-716. 2003.

GRACELI, J.B.; SENA, G.C.; LOPES, P.F.I.; ZAMPROGNO, G.C.; COSTA, M.B.; GODOI, A.F.L.; SANTOS, D.M.; MARCHI, M.R.R.; FERNANDEZ, M.A. Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**. v. 36, p. 40-52, 2013.

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.

HORIGUCHI, T.; KOJIMA, M.; HAMADA, F.; KAJIKAWA, A.; SHIRAISHI, H.; MORITA, M.; SHIMIZU, M. Impact of Tributyltin and Triphenyltin on Ivory Shell (*Babylonia japonica*) Populations. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, 2006.

HORIGUCHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M.; MORITA, M. Imposex in Sea Snails, Caused by Organotin (Tributyltin and Triphenyltin) Pollution in Japan: a Survey. **Applied Organometallic Chemistry**. v. 11, p. 451-455, 1997.

HORIGUCHI, T.; IMAI, T.; CHO, H.S.; SHIRAISHI, H. SHIBATA, Y.; MORITA, M. E SHIMIZU, M. Acute Toxicity of Organotin Compounds to the Larvae of the Rock Shell, *Thais clavigera*, the Disk Abalone, *Haliotis discus*, and the Giant Abalone, *Haliotis madaka*. **Marine Environmental Research**. v. 46, n. 1-5, p. 469-473, 1998.

HUGGETT, R.J.; UNGER, M.A.; SELIGMAN, P.F.; VALKIRS, A.O. The marine biocide tributyltin: assessing and managing the environmental risks. **Environmental Science and Technology**. v. 26, p. 232-237, 1992.

JENSEN, H.F.; HOLMER, M.; DAHLLÖF, I. Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, p. 564–573. 2004.

KAN-ATIREKLAP, S. ; TANABE, S. ; SANGUANSIN, J; TABUCANON, M.S.; HUNGSPREUGS, M. Contamination by Butyltin Compounds and Organochlorine Residues in Green Mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand Coastal Waters. **Environmental Pollution**. v. 97, n. 1-2, p. 79-89, 1997.

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

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.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**. 90, S77–S85, 2009.

LANGSTON, W. J E POPE, N.D. Determinants of TBT Adsorption And Desorption in Estuarine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 32-43, 1995.

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.

LIMA, A.F.A.; CASTRO, I.B.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Inposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 24. n.1. p. 85-90, 2006.

LIMA, A.F.A.; CASTRO, I.B.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Inposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. **Brazilian Journal of Oceanography**. v.24. n.1. p. 85-90, 2006.

LIMAVERDE, A.M.; WAGENER, A.L.R.; FERNANDEZ, M.A.; SCOFIELD, A.L.; COUTINHO, R. *Stramonita haemastoma* as bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine Environmental Research**. v. 64, p. 384-398, 2007.

LO, S.; ALLÉRA, A.; ALBERS, P.; HEIMBRECHT, J.; JANTZEN, E.; KLINGMULLER, D.; STECKELBROECK, S.; Diethioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **Journal of Steroid Biochemistry**. v. 84. p.569-76, 2003.

MAGALHÃES, C.A.; STRUCHI, P.P.; ASBAHR, M. Evidências de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Prosobranchia) em áreas portuárias do estado de São Paulo. **Proceedings, COLACMAR**. v. 282, 1997.

MAGALHÃES, D. P.; FERRA-O FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

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

MENSINK, B. P.; KRALT, H.; VETHAAK, A. D.; HALLERS-TJABBES, C. C. T.; KOEMAN, J. H.; HATTUM, B. V.; BOON, J. P. Imposex induction in laboratory reared

juvenile *Buccinum undatum* by tributyltin (TBT). **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.11, p. 49 – 65, 2002.

MICHEL, P.; AVERTY, B. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update, **Marine Pollution Bulletin**. v.38, n. 4, p. 268–275, 1999.

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

MORAES, R. B. C.; CRAPEZ, M. A. C.; PFEIFFER, W. C.; MARCOS FARINA; TEIXEIRA, V. L.; BAINY, A. C. A. Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos. 1^o ed. São Paulo: **Arte & Ciência Villipress**. v.1, p.9-11. 2001.

MORCILLO, Y.; PORTE, C. Evidence of Endocrine Disruption in the Imposex-Affected Gastropod *Bolinus brandaris*. **Environmental Research**. v. 81, p. 349-354, 2002.

MORCILLO, Y.; PORTE, C. Monitoring of organotin compounds and their effects in marine molluscs. **Trends in analytical chemistry**. v. 17, n 2. p. 109-116. 1998.

NAVIO, J. A.; MARCHENA, F. J.; CERRILLOS, C. UV photolytic degradation of butyltin chlorides in water. **Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry**, v. 71, p. 97-102, 1993.

NEGRI, A.P.; HALES, L.T.; BATTERSHILL, C.; WOLFF, C.; WEBSTER, N.S. TBT contamination identified in Antarctic marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v.48. p. 1142-1144. 2004.

OEHLMANN, J., BAUER, B., MINCHIN, 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.

OEHLMANN, J.; FIORONI, P.; STROBEN, E; MARKERT, B. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. **The Science of the Total Environment**. v.188, p. 205-223, 1996.

OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; FIORONI, P. The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). **Journal of Molluscan Studies**. v. 57, p. 375-390, 1991.

PEDRUZZI, F.C. **Análise da contaminação por Organoestânicos no litoral do Espírito Santo, sobre a razão sexual de *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791), por meio de duas metodologias: Convencional e Não-destrutiva**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

RANTAKOKKO, P., KUNINGAS, T., SAASTAMOINEN, K., VARTIAINEN, T. Dietary intake of organotin compounds in Finland: a market-basket study. **Food Addit Contam**. v.23, p.749-756, 2006.

RIBEIRO V. **Avaliação do Potencial da Espécie *Stramonita haemastoma* (Kool,1987) como indicador biológico de contaminação ambiental por compostos Organo-estânicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Universidade Federal Fluminense. 2002.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande: Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, 1994. 492p.

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.

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

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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 381, p. 380-387, 2004.

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

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 granulosa-like tumour cell line KGN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 289, p. 198-204, 2001.

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

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

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

SHIM W.J.; KAHNG S.H.; HONG S.H.; KIM N.S.; SHIM J.H. Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. **Marine Environmental Research**. v. 49, n.435 - 451, 2000.

SMITH, A. J.; THAIN, J. E.; BARRY, J. Exploring the use of caged *Nucella lapillus* to monitor changes to TBT hotspot areas: A trial in the River Tyne estuary (UK). **Marine Environmental Research**. v.62, p. 149–163, 2006.

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.

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.

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.

STRAND, J.; JORGENSE, A.;TAIROVA, Z. TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea. **Environment International** v.35, p. 707-711. 2009.

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.

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

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

TITLEY-O'NEAL, C.P.; 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.

TOMMASI, Luis Roberto. **A degradação do meio ambiente**. 3^o ed. São Paulo: Nobel, 1977.

TOSTE, R.; PESSOA, I.A.; DORE, M.P.; PARAHYBA, M.A.; FERNANDEZ, M.A. Is a phallic vas deferens development in females related to the distance from organotin sources? A study with *Stramonita haemastoma*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.91, p. 162–170, 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.

VAN DEN BROECK, H.; DE WOLF, H.; BACKELJAU, T.; BLUST, R.; Comparative assessment of reproductive impairment in the gastropod mollusk *Littorina littorea* along the Belgian North Sea coast. **Science of the Total Environment**, v. 407, p.3063–3069, 2009.

VASCONCELOS, P.; GASPAR, M. B.; CASTRO, M. Development of índices for nonsacrificial sexing of imposex-affected *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae). **Journal of Molluscan Studies**. v.72. p.285-294, 2006.

VERMEIJ, G. J. Distribution, history, and taxonomy of the thaisclade (gastropoda: muricidae) in the neogene of tropical america. **Journal of Paleontology**, v.75, p. 697-705. 2001.

VISHWAKIRAN, Y.; ANIL, A.C.; VENKAT, K.; SAWANT, S.S. *Gyrineumnator*: a potencial indicator of imposex along the Indian coast. **Chemosphere**. v. 62. p.1718-1725, 2006

WHO: World Health Organization. Tributyltin Compounds. Geneva, 1990.

YEBRA, D.M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling Technology – Past, Present and Future Steps Towards Efficient and Environmentally Friendly Antifouling Coatings. **Prog. Org. Coat.** v. 50. p. 75-104, 2004.