

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

DEYSE BEZERRA DE AZEVEDO

**IMPOSEX EM *STRAMONITA HAEMASTOMA* (MOLLUSCA: GASTROPODA):
REAVALIAÇÃO NA ZONA METROPOLITANA DE FORTALEZA E
INDUÇÃO EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.**

**FORTALEZA – CE
2011**

DEYSE BEZERRA DE AZEVEDO

IMPOSEX EM *STRAMONITA HAEMASTOMA* (MOLLUSCA: GASTROPODA):
REAVALIAÇÃO NA ZONA METROPOLITANA DE FORTALEZA E INDUÇÃO
EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Mestrado em Ciências Marinhas
Tropicais como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Marinhas.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina de Almeida
Rocha-Barreira

FORTALEZA – CE
2011

DEYSE BEZERRA DE AZEVEDO

**IMPOSEX EM *STRAMONITA HAEMASTOMA* (MOLLUSCA: GASTROPODA):
REAVALIAÇÃO NA ZONA METROPOLITANA DE FORTALEZA E
INDUÇÃO EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina de Almeida Rocha-Barreira

Aprovada em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina de Almeida Rocha Barreira (Orientadora)

Dra. Helena Matthews Cascon (Membro efetivo)

AGRADECIMENTOS

Sempre temos muitos agradecimentos a fazer, e dificilmente conseguimos expressar a importância de cada pessoa com um simples “muito obrigado”. Mas existem aqueles que não podemos deixar de citar, deixando registrada a gratidão.

Agradeço em primeiro lugar à professora Cristina. Não poderia ser diferente, pois foi ela quem me recebeu no laboratório de Zoobentos há alguns anos e acreditou no meu trabalho, primeiro como graduanda, agora como mestranda.

Sem ele eu acho que seria tudo muito complicado! Ítalo, você me ensinou muitas coisas! Meu orientador virtual, sempre atento aos e-mails cheios de dúvidas, sempre disposto a ajudar, explicar... Eu só posso dizer: MUITÍSSIMO obrigada a você!

Agradeço a todos do Zoobentos, que com maior ou menor participação, fizeram do laboratório mais que um local de trabalho, mas um lugar de troca de experiências, conversas, risadas.

E não poderia deixar de agradecer à Hianna e ao Breno, meu querido “Brenim”, pelas incontáveis coletas que me ajudaram a fazer, e por todos os outros momentos que fizeram desse trabalho algo divertido e prazeroso.

Agradeço também aos meus pais, porque foram eles que me deram suporte durante toda a vida acadêmica e nesses anos de mestrado não foi diferente. Agradeço por agüentarem também minha bagunça, quando trabalhava em casa, mantendo centenas de “bichinhos” na garagem...

E por fim, meus agradecimentos ao CNPQ, pela concessão da bolsa, de grande importância no desenvolvimento de todo o trabalho.

RESUMO

O imposex, uma síndrome que acomete gastrópodes expostos à contaminação por compostos orgânicos de estanho, tem sido amplamente utilizada como bioindicador da contaminação ambiental por esses compostos. O imposex foi avaliado em *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) através de duas abordagens: 1. A reavaliação de áreas sob influência do terminal portuário do Mucuripe com registros anteriores de imposex; e 2. A indução do imposex em exemplares de *S. haemastoma* em laboratório, através de injeções de cloreto de tributilestanho (TBT). Para a reavaliação do imposex foram realizadas coletas em 11 estações ao longo da costa de Fortaleza e região metropolitana, consideradas sob influência das atividades no porto do Mucuripe em função do sentido das correntes. Como resultado foi observada uma redução dos índices de quantificação em todas as estações, caracterizando uma redução da contaminação por compostos orgânicos de estanho na área. Apenas uma estação (E8 – Praia Mansa) ainda apresentou 100% de fêmeas afetadas pela síndrome, apresentando também indícios de declínio populacional. Houve redução na área de incidência de imposex na área de influência do porto do Mucuripe, bem como foram identificadas outras duas possíveis fontes de contaminação por compostos orgânicos de estanho na costa de Fortaleza. Nos experimentos de indução do imposex, os animais foram divididos em três grupos: EX (experimento), CA (controle com álcool) e CN (controle nulo). Os animais receberam injeções com doses controladas de cloreto de tributilestanho (EX) e álcool absoluto (CA). O bioensaio demonstrou que o TBT foi capaz de induzir o imposex em *S. haemastoma*, sendo observada a correlação entre o tempo de exposição ao contaminante e o desenvolvimento da síndrome. A mortalidade de animais foi alta no grupo EX após as injeções, caracterizando a toxicidade aguda do TBT. A porcentagem de imposex foi crescente ao longo de 45 dias, chegando a 75% no final do experimento. Os demais índices (FPLI, RPLI e VDSI) também foram crescentes. FPLI (*female penis length index*) atingiu 0,46; RPLI (*relative penis length index*) 13,86 e VDSI (*vas deferens sequence index*) atingiu grau II.

Palavras-chave: imposex. *Stramonita haemastoma*. Indução. Reavaliação.

ABSTRACT

Imposex, a syndrome which affects gastropods exposed to organotin compounds, has been widely used as a bioindicator of environmental contamination by these compounds. Imposex was evaluated in *Stramonita haemastoma* (Linnaeus 1767) by two different approaches: 1. Imposex reinspection in areas under influence of Mucuripe port with previous records of the syndrome; and 2. Imposex induction on *S. haemastoma* specimens, under laboratory conditions by TBT injections. To the imposex reinspection, eleven stations were sampled along Fortaleza and vicinity coast, considered under influence of Mucuripe port according to the currents direction. The results have shown indexes reduction at all stations, which indicates a reduction in contamination by organotin compounds in the area. Only station (E8 – Mansa Beach) showed 100% of females affected by imposex, also showing indications of population decline. There was a reduction in the imposex incidence area and it has been also identified two other possible sources of contamination by organotin compounds on Fortaleza coast. In experiment animals were divided in three groups: EX (experiment), CA (alcohol control) and CN (null control). The animals were injected with tributyltin chloride (EX) and absolute alcohol (CA). The bioassay has shown that TBT chloride is efficient in inducing imposex in *S. haemastoma*. There was correlation between imposex development and exposure time. The percentage of imposex has increased during the experiment, reaching 75% at its end. Other indexes like FPLI, RPLI and VDSI also have risen and showed correlation with time. FPLI (*female penis length index*) has reached 0,46; RPLI (*relative penis length index*), 13,86 and VDSI (*vas deferens sequence index*) has reached degree II.

Key-words: Imposex. *Stramonita haemastoma*. Indução. Reavaliação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Ciclo simplificado dos compostos organoestânicos no meio marinho (CASTRO *et al.* 2007a)..... 15
- Figura 2. Mecanismo proposto para imposex induzido por TBT. TBT ativa o RXR sinalizando o início da transcrição de genes necessários para o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino (A) diretamente, ligando-se e ativando RXR; ou (B) indiretamente, inibindo acil coenzima A:aciltransferase (ATAT) resultando no aumento do nível de retinóide endógeno. RXR é então ativado pelo retinóide endógeno livre. (adaptado de STERNBERG *et al.* 2010)..... 21
- Figura 3. Estágios do desenvolvimento do pênis e do vaso deferente (VDSI) proposto por GIBBS *et al.* (1987) para *Nucella lapillus*. 23
- Figura 4. Escala de desenvolvimento do imposex segundo STROBEN *et al.* (1995). Legenda: ac, cápsulas abortadas; cg, glândula de cápsulas; gp, papila genital; obc, bolsa copulatória aberta; ocg, glândula de cápsulas aberta; ocv, oclusão da vulva; p, penis sem dutio espermático; pd, pênis com duto espermático; pr, próstata; te, tentáculo; vd, vaso deferente; vdp, passagem do vaso deferente pela glândula de cápsulas; vds, seção do vaso deferente. 24
- Figura 5. Escala de desenvolvimento do imposex (IDI) proposta para *Stramonita haemastoma*, detalhando rotas alternativas do desenvolvimento do pênis. Legenda: pa – papila; vdi – vaso deferente inicial: p1 – pênis inferior a 2mm; 1/3vd – vaso deferente com 1/3 do comprimento; p2 – pênis com mais de 2mm; 2/3vd – vaso deferente com 2/3 do seu comprimento; vdc – vaso deferente completo; gc – glândula da cápsula (QUEIROZ *et al.* 2007). 26
- Figura 6. Vista dorsal e ventral de um exemplar de *Stramonita haemastoma* (Foto: Deyse Azevedo)..... 30
- Figura 7. Imagem aérea do Terminal Portuário do Mucuripe (Fonte: Cia Docas do Ceará, 2011)..... 36

Figura 8. Partes moles de fêmea de <i>S. haemastoma</i> , evidenciando o receptáculo seminal. RS: receptáculo seminal. (Foto: Deyse Azevedo).....	38
Figura 9. Percentual de ocorrência de imposex nas populações de <i>Stramonita haemastoma</i> coletadas nas 11 estações avaliadas na região metropolitana de Fortaleza, Ceará.....	40
Figura 10. Relação entre comprimento da concha e pênis em machos e fêmeas com imposex de <i>S. haemastoma</i> coletados na costa da região metropolitana de Fortaleza, Ceará.....	42
Figura 11. Tamanho médio das conchas (machos+fêmeas) dos exemplares de <i>S. haemastoma</i> coletados na costa da região metropolitana de Fortaleza - Ceará, nas campanhas 2004/2005 e 2010/2011. nd: não houve diferença.....	43
Figura 12. Comparação do VDSI de <i>S. haemastoma</i> na costa de Fortaleza nas campanhas 2004/2005 e 2010/2011.	43
Figura 13. Resultados do monitoramento realizado na costa da região metropolitana de Fortaleza sob a influência do terminal Portuário do Mucuripe nos anos de 2004/2005 (Castro et al, 2007c) e 2010/2011 (presente estudo) utilizando a espécie <i>S. haemastoma</i>	44
Figura 14. Gráfico comparativo entre FPLI em <i>S. haemastoma</i> nas campanhas 2004/2005 e 2010/2011.	46
Figura 15. Gráfico comparativo para RPLI em <i>S. haemastoma</i> entre as campanhas 2004/2005 e 2010/2011	46
Figura 16. Partes moles de fêmea de <i>S. haemastoma</i> com imposex. P: pênis; RS: receptáculo seminal; VD: vaso deferente. (Foto: Deyse Azevedo).....	57

Figura 17. Percentual de exemplares de <i>S. haemastoma</i> mortos durante o período de aclimatação (15 dias anteriores ao início do experimento). CN: controle nulo; EX: experimento; CA: controle com álcool.....	58
Figura 18. Número de indivíduos de <i>S. haemastoma</i> mortos durante o experimento de indução do imposex. CN: controle nulo; EX: experimento; CA: controle com álcool..	59
Figura 19. Percentual de fêmeas de <i>S. haemastoma</i> com imposex, observadas durante o experimento de indução.....	60
Figura 20. FPLI (<i>female penis length index</i>) de <i>S. haemastoma</i> observado durante o experimento de indução.....	60
Figura 21. RPLI (<i>relative penis length index</i>) de <i>S. haemastoma</i> observado durante o experimento de indução.....	61
Figura 22. Percentual de fêmeas de <i>S. haemastoma</i> nos diferentes estágios de VDSI (<i>vas deferens sequence index</i>) observado durante o experimento de indução.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estágios desenvolvimento de imposex em <i>Nucella lapillus</i> segundo GIBBS <i>et al.</i> (1987).	22
Tabela 2. Estágios de VDSI propostos por FERNANDEZ <i>et al.</i> (2002) para <i>Stramonita haemastoma</i>	25
Tabela 3. Georreferenciamento das estações de coleta na área de influência do Terminal Portuário do Mucuripe utilizadas por Castro <i>et al.</i> (2007c) e no presente estudo.	37
Tabela 4. Índices de imposex em <i>Stramonita haemastoma</i> coletadas na costa da região metropolitana de Fortaleza, sob a influencia do Terminal Portuário do Mucuripe no período de Nov/2010 a Fev/2011. N: número amostral; ♂/♀: machos/fêmeas: FPLI (\pm DP): <i>female penis lenght index</i> (\pm desvio padrão); RPLI: <i>relative penis lenght index</i> ; VDSI (\pm DP): <i>vas deferens sequence index</i> (\pm desvio padrão).	41
Tabela 5. Comparação do VDSI e FPLI em <i>Stramonita haemastoma</i> na costa da região metropolitana de Fortaleza, sob a influência do Terminal Portuário do Mucuripe observado nas campanhas de 2004 e 2010 (teste Mann-Whitney).	45
Tabela 6. Resultados do experimento de indução do imposex em <i>S. haemastoma</i>	59

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Compostos orgânicos de estanho	13
1.2 Efeitos dos COEs sobre a fauna.....	17
1.3 Imposex.....	19
1.4 Imposex e biomonitoramento	27
1.5 Uso de bioindicadores.....	29
1.6 <i>Stramonita haemastoma</i>	30
1.7 Hipóteses de trabalho e objetivo geral.....	32
Capítulo I: Reavaliação do imposex em <i>Stramonita haemastoma</i> na região metropolitana de Fortaleza, Ceará – Brasil.	33
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. OBJETIVO	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1 Área de estudo - Terminal Portuário do Mucuripe	36
3.2 Biomonitoramento.....	37
3.3 Avaliação do imposex	38
3.4 Análises estatísticas.....	39
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	52

Capítulo II: Indução do imposex em <i>Stramonita haemastoma</i> em condições de laboratório.....	53
1 INTRODUÇÃO.....	53
2 OBJETIVOS.....	54
3 METODOLOGIA.....	55
3.1 Bioensaio.....	55
3.2 Análise dos níveis de imposex.....	56
3.3 Análises estatísticas.....	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Mortalidade.....	58
4.2 Quantificação do imposex.....	59
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Compostos orgânicos de estanho

Os compostos organoestânicos (COEs) têm sido utilizados para diversos fins há muitos anos. No entanto, começaram a se destacar por volta de 1940, quando passaram a ser intensamente utilizados como estabilizantes industriais, com a expansão da indústria de plásticos e o reconhecimento da importância do cloreto de polivinila (PVC) (GODOI *et al.* 2003),

Apesar das propriedades biocidas de organoestânicos como o Tributilestanho (TBT) e o Trifenilestanho (TPT) terem sido descobertas ainda na década de 1950, seu emprego com esta finalidade só se tornou comum na década de 1970 (OYEWO, 1989). COEs são utilizados em pesticidas, fungicidas, algicidas, como princípio ativo de tintas antiincrustantes e para outros fins, como na preservação de madeira (HOCH, 2001).

No ambiente marinho, sua introdução passou a ser bastante significativa pela utilização de tintas a base de tributilestanho (TBT), encontrado sozinho ou associado ao trifenilestanho (TPT) (HORIGUCHI *et al.* 1994). Tais tintas eram utilizadas em estruturas submetidas ao contato direto e prolongado com a água do mar, como cascos de embarcações, estruturas destinadas à aquicultura, instalações *off shore* e dutos (CHAMP, 2000). A utilização dessas tintas visava inibir a bioincrustação ou *fouling*, uma vez que esta é extremamente prejudicial para embarcações e outras estruturas. Nas embarcações, as comunidades aderidas elevam o atrito do casco com a água, o que gera uma maior exigência da potência dos motores e conseqüentemente aumenta o consumo de combustível e diminui o período entre docagens para manutenção. No caso de estruturas destinadas à aquicultura, a bioincrustação reduz drasticamente o tempo de vida útil das mesmas.

Outro problema associado à incrustação de organismos é a bioinvasão veiculada pela comunidade aderente aos cascos das embarcações, bem como pela água de lastro (SILVA *et al.*, 2004). Desta forma, apesar de serem extremamente danosas ao ambiente, as tintas antiincrustantes são de grande importância no sentido de minimizar formação de comunidades incrustantes nas embarcações e, conseqüentemente, reduzir os riscos da

exportação e importação de espécies exóticas, além de reduzir gastos com manutenção de estruturas marítimas.

No passado, tintas à base de cobre (CuO e CuO_2) eram utilizadas para este fim, no entanto com a descoberta da grande eficiência das tintas à base de TBT quando comparadas àquelas anteriormente utilizadas, o uso de tintas com COEs como princípio ativo cresceu drasticamente.

Assim, as principais fontes de compostos organoestânicos para o ambiente marinho passaram a ser as áreas de intenso fluxo de embarcações e por esse motivo, a contaminação por esses compostos tem sido relacionada de forma direta a áreas onde há atividade marítima, como portos, estaleiros, marinas etc (HUET *et al.* 1995; CASTRO *et al.* 2005; HARINO *et al.* 2009; RODRÍGUEZ *et al.* 2009).

No entanto, o estanho também entra no ambiente por outras fontes, que muitas vezes são negligenciadas. Uma fonte de contaminação é a liberação de compostos metilados, butilados, dimetilados e octibulados de estanho usados na estabilização do PVC, que podem ser lixiviados durante as primeiras utilizações de canos PVC, liberando consideráveis quantidades de estanho no ambiente (DOKKUM & HUWER, 2005).

A aplicação de pesticidas contendo compostos orgânicos de estanho é outra fonte de contaminação importante, uma vez que pode contaminar solos, ar e águas superficiais e subterrâneas (FENT, 1996; OLIVEIRA & SANTELI, 2010)

Ao serem liberados na água, compostos como o TBT e TPT sofrem diversos processos de natureza física, química e biológica (Figura 1), que afetam sua concentração na coluna d'água e sedimentos. Processos físicos como a dispersão e o transporte através das correntes podem ser responsáveis pela presença do composto em áreas relativamente distantes da fonte de liberação.

Os organoestânicos são conhecidamente tóxicos, estando sua toxicidade associada ao número de radicais butil ou fenil encontrados no composto. A toxicidade é máxima naqueles com três radicais, diminuindo à medida que os radicais são perdidos. A adição de um quarto radical, por sua vez, diminui a toxicidade do composto.

Fatores abióticos como a radiação UV, radiação gama e temperatura e também fatores bióticos como a biodegradação bacteriana são responsáveis pela degradação progressiva dos compostos organoestânicos originando compostos mais simples e menos tóxicos. A degradação do TBT gera o DBT (dibutilestanho) e o MBT

(monobutilestanho), enquanto o TPT é degradado a DPT (difenilestanho) e MPT (monofenilestanho). A última etapa do processo é a formação do estanho inorgânico que praticamente não é tóxico (CLARK *et al.*, 1988).

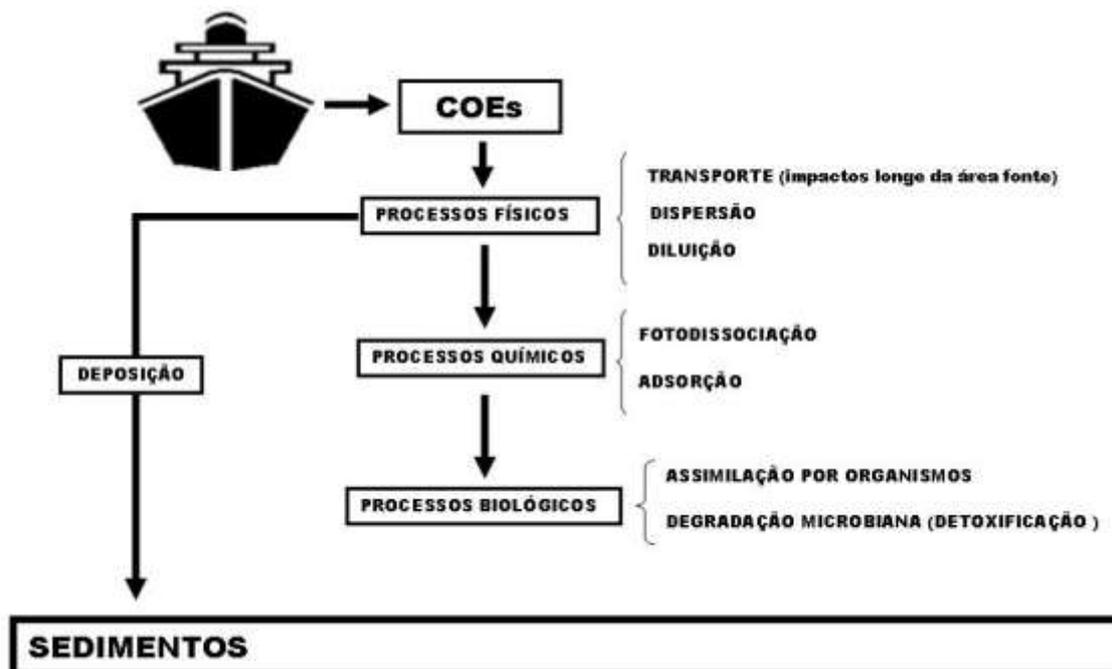


Figura 1. Ciclo simplificado dos compostos organoestânicos no meio marinho (CASTRO *et al.* 2007a)

Preocupações sobre do impacto do TBT em organismo não-alvo devido sua alta toxicidade levaram à introdução de controles legislativos para seu uso em diversos países (EVANS *et al.* 1995a). Na década de 80, a França proibiu o uso de tintas à base de TBT em embarcações menores de 25m e medidas similares foram tomadas por diversos outros países como Reino Unido, Estados Unidos, Nova Zelândia, Austrália e Noruega (ALZIEU, 1991; WAITE *et al.*, 1991; WADE *et al.*, 1991; STEWART *et al.*, 1992; FOALE, 1993). Outros países, como Japão (HORIGUSHI *et al.*, 1998a e 1998b) e Nova Zelândia (CHAMP, 2000) baniram totalmente o uso destas tintas. A partir de 1º de janeiro 2003, a Organização Marítima Internacional determinou o fim da aplicação de tintas a base de compostos orgânicos de estanho e 1º de janeiro de 2008, como última data para que qualquer navio ainda contivesse tintas a base de tal composto. Estas medidas reduziram severamente a contaminação em algumas áreas, no entanto, apesar de algumas regiões apresentarem decréscimo nas concentrações de TBT, vários anos após a regulamentação, compostos organoestânicos ainda são detectados no ambiente e

em organismos marinhos, especialmente em áreas de intenso tráfego marítimo (HORIGUCHI *et al.* 2003; CHOI *et al.* 2009; EGUCHI *et al.* 2010).

Tem-se observado que o TBT tende a permanecer no sedimento de 0.9 – 5.2 anos (GIBBS & BRYAN, 1994), enquanto na coluna d'água sua meia-vida é bastante reduzida, sendo de apenas poucos dias. Alguns estudos têm relatado que o TBT permanece mais tempo nos sedimentos que na coluna d'água devido sua maior estabilidade neste compartimento (TAKEUSHI *et al.* 2004). Assim, depósitos bentônicos representam fonte de TBT biologicamente disponível, seja por sua remobilização ou como um resultado direto da acumulação (CLARK *et al.*, 1988; MORA & PHILLIPS, 1997, CHOI *et al.* 2009).

Análises de TBT feitas por HORIGUCHI *et al.* (2003) nos sedimentos em Vancouver, Canadá, não demonstraram declínio temporal na concentração de TBT, mesmo após seu completo banimento, o que pode estar relacionado à sua persistência neste compartimento. CHOI *et al.* (2009) demonstraram que, com o passar dos anos, houve um declínio nas concentrações de TBT na água e nos tecidos de bivalves na costa da Coreia, no entanto, o mesmo padrão não foi observado nos sedimentos, corroborando com outros estudos que mostram a maior tendência dos sedimentos em acumular tais compostos.

A grande afinidade do TBT por material particulado, devido sua alta hidrofobicidade, favorece seu acúmulo em sedimentos finos como as lamas estuarinas, mais do que em sedimentos grosseiros, como areia (LANGSTON e POPE, 1995).

Outras características do ambiente como a salinidade e a temperatura afetam a adsorção do TBT ao material particulado e também são responsáveis pela disponibilidade de TBT para coluna d'água sendo este menos disponível em baixa salinidade - quando a adsorção ao material particulado é maior - tornando-se mais disponível à medida que a salinidade aumenta (LANGSTON e POPE, 1995), o que pode ser um fator agravante da contaminação em áreas marinhas.

Seu acúmulo nos fundos oceânicos afeta diversos organismos bentônicos, além de muitos outros organismos não-alvo, sendo um grande problema para a biota em geral. No Brasil, a Resolução nº 357 de 2005 do CONAMA determina os níveis máximos permitidos dessa substância nas águas salinas e salobras em 0,37 µg/L. Levando-se em conta que alguns organismos, como gastrópodes prosobrânquios, apresentam respostas aos organoestênicos na ordem de 1 ng Sn/L (GOODING *et al.*

2003), este é um limite ainda muito elevado, sendo um problema para os ecossistemas costeiros.

1.2 Efeitos dos COEs sobre a fauna

O primeiro caso onde se comprovou a ação tóxica do TBT ocorreu em 1975, na França com uma queda na produção do molusco bivalve *Crassostrea gigas* cultivado em uma área cercada por marinas e pequenos portos na Baía de Arcachon (ALZIEU *et al.*, 1982). Naqueles cultivos, observou-se diminuição do número de jovens recém fixados, anomalias de desenvolvimento nas larvas e, nos indivíduos adultos, a formação de septos entre as camadas de carbonato de cálcio, um fenômeno conhecido como “balling”, que afeta o valor comercial destes animais (ALZIEU *et al.*, 1982; RUIZ *et al.*, 1996).

A partir de então, diversos outros estudos têm demonstrado o efeito negativo da contaminação por compostos organoestênicos em diferentes espécies. Diversos cultivos em outros locais do mundo como os de *Perna viridis* (KAN-ATIREKLAP *et al.*, 1997a e 1997b ; PRUDENTE *et al.*, 1999), *Crassostrea gigas* (WALDOCK *et al.*, 1995 e 1999) e do gastrópode *Chorus giganteus* (GOODING *et al.*, 1999) também tem sofrido com a ação tóxica do TBT, que causa principalmente inibição do crescimento e aumento das taxas de mortalidade.

Resíduos de TBT já foram encontrados e alguns de seus efeitos descritos em grupos como crustáceos (OHJI *et al.* 2005, KWOK e LEUNG 2005), moluscos (PELIZZATO *et al.* 2004; MENG *et al.* 2005) e peixes (THIBAUT e PORTE, 2004; RABITTO *et al.* 2005,).

Além disso, por serem compostos que se bioacumulam, podem ser passados entre os organismos através dieta alimentar (MENSINK *et al.*, 1997; MORCILLO *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2002; MENG *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2006), afetando diferentes níveis tróficos (TAKAHASHI *et al.* 1999a).

Estes compostos também já foram detectados em fígado e rins de diversos mamíferos marinhos e terrestres (TAKAHASHI *et al.*, 1999b e LE *et al.*, 1999; STRAND *et al.* 2005) sobretudo em cetáceos e sirênios além de ursos polares e humanos. GURUGE *et al.* (1997) detectaram a presença de COEs em diversas aves marinhas, demonstrando a contaminação generalizada de animais de níveis tróficos

altos, mesmo em áreas remotas. Experimentos realizados com ratos e coelhos evidenciaram a natureza imunossupressora e citotóxica do TBT para mamíferos. Além disso, devido sua lipofilicidade, compostos orgânicos de estanho podem ser considerados ativos nas membranas, causando alterações e podendo levar à morte celular o que sugere que estes compostos podem ser potencialmente perigosos para seres humanos (TANABE *et al.*, 1998; TANABE, 1999; YAMADA *et al.* 2010).

Em muitas espécies, especialmente de moluscos gastrópodes, os organoestânicos atuam como disruptores hormonais, que afetam em nível bioquímico a síntese ou processamento de algum hormônio. Como atuam em sítios metabólicos específicos, pequenas quantidades de contaminante, podem causar respostas drásticas nos organismos (MATTHIESSEN & GIBBS, 1998; GOODING *et al.* 2003)

Sua atividade como xenobiótico causa a masculinização de fêmeas (SHIMASAKI *et al.* 2003), chegando inclusive a promover em alguns animais uma mudança total e radical de sexo, como é o caso dos crustáceos copépodes *Paramphiascella hyperborea* e *Stenhelia gibba* (DEPLEDGE e BILLINGHURST, 1999). No entanto, a via de atuação do composto ainda não foi completamente elucidada, havendo diversas hipóteses que podem ser válidas.

Por se acumularem em diversos níveis tróficos, os compostos organoestânicos podem chegar aos seres humanos através da dieta, principalmente através da ingestão de peixes e outros produtos da aquicultura. FERNANDEZ *et al.* (2005a), em avaliação preliminar dos riscos à saúde humana pela ingestão de mariscos contaminados, apontaram para a necessidade urgente de aumentar os conhecimentos sobre as concentrações de poluentes nos mariscos e suas taxas de ingestão pela população. LEE *et al.* (2005) sugeriram um potencial risco à saúde humana que pode ser causado pela ingestão de peixes contaminados com TBT.

Um painel científico da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) avaliou os riscos à saúde dos consumidores associados à exposição ao COEs nos gêneros alimentícios e criou um nível de Ingestão Diária Tolerável (TDI) de 250 ng/kg de peso corporal, para a soma de dibutilestanho DBT, TBT, TPT e dioctilestanho (DOT), devido à similaridade de suas propriedades imunotóxicas (EFSA, 2004). Um estudo realizado na Finlândia demonstrou que o consumo de apenas algumas espécies de peixes pode contribuir com até 1,3% desse total (AIRAKSINEN *et al.* 2010). Além do consumo de peixes, as populações também podem estar expostas aos compostos organoestânicos por diversas outras fontes, como mariscos em geral. BRAGA *et al.*

(2006) encontraram altos índices de imposex, um indicador da contaminação por organoestânicos, em moluscos comercializados para consumo humano, assim demonstrando a urgência em se estudar os efeitos que esses compostos podem vir a causar em populações que ingerem o pescado marinho. GUÉRIN *et al.* (2007), em estudo realizado na França, demonstraram que grandes consumidores de frutos do mar como peixes, moluscos e crustáceos, podem ingerir até 12% do total semanal estabelecido pela EFSA, podendo chegar a 40% nos piores casos. Assim, como os consumidores estão expostos a outras fontes, como pesticidas etc, não havendo estudos epidemiológicos acerca da exposição oral crônica aos COEs e seus efeitos aditivos à saúde ainda estarem incompreendidos, é de grande importância monitorar as áreas contaminadas por esses compostos a fim de avaliar se está ocorrendo redução efetiva da contaminação.

1.3 Imposex

Em gastrópodes, a contaminação por COEs provoca uma síndrome na qual as fêmeas afetadas desenvolvem estruturas sexuais secundárias masculinas, como pênis e/ou vaso deferente. O imposex, como é chamada a síndrome, é o mais bem documentado exemplo de efeito causado pelos organoestânicos e é frequentemente citado como um exemplo de desregulação endócrina.

Na década de 70, BLABER (1970) fez a primeira observação acerca do surgimento de uma estrutura similar a um pênis em fêmeas de *Nucella lapillus*, e em 1971, Smith chamou esse fenômeno de imposex quando observou sua presença no gastrópode *Nassarius obsoletus* (SMITH, 1971). Estudos mais detalhados com a espécie *Nucella lapillus* foram realizadas no sudeste de Inglaterra e a partir deles foram desenvolvidas grande parte das metodologias atualmente utilizadas para o estudo do imposex (GIBBS e BRYAN, 1986; BRYAN *et al.*, 1987a).

Ao longo dos anos, diversas hipóteses têm sido propostas para definir possíveis mecanismos pelo qual o TBT causa imposex, no entanto, até o presente, nenhuma foi completamente comprovada.

Durante muitos anos, a hipótese mais aceita levava em consideração a elevação da testosterona livre, observada em fêmeas afetadas pela síndrome (SPOONER *et al.*

1991; GOODING *et al.* 2003). A hipótese propõe que o aumento da testosterona iniciaria, então, uma cascata de reações que levariam ao desenvolvimento do imposex.

Diversos estudos foram realizados relacionando esse incremento na testosterona à inibição de enzimas que convertem esteróides em vários metabólitos. (GOODING *et al.* 2003; MORCILLO e PORTE, 1998; JANER *et al.* 2005) Um desses complexos enzimáticos é o citocromo P450 aromatase-dependente, que converte testosterona em 17- β -estradiol. Sua inibição causaria o acúmulo de testosterona livre nos tecidos, causando masculinização.

Outro complexo, o acil coenzima A:aciltransferase (ATAT) é o responsável pela manutenção da homeostase da testosterona a partir da transformação do hormônio livre em ésteres de ácidos graxos (GOODING e LeBLANC, 2001). Assim, a inibição competitiva do TBT pelo sítio de ligação da ATAT inibe o processo regulador da manutenção da homeostase da testosterona, a esterificação de ácidos graxos, aumentando o nível de hormônio livre (STERNBERG e LeBLANC, 2006).

No entanto, não há evidência significativa sobre o papel da testosterona no desenvolvimento sexual de moluscos gastrópodes (STERNBERG *et al.* 2008). Assim, apesar da elevação da testosterona poder ser explicada pela inibição da ATAT, ainda há uma ausência de evidências sobre o papel desse hormônio na recrudescência, ou seja, no desenvolvimento anual do trato reprodutivo desses organismos, o que torna problemática a aceitação de tal hipótese. Segundo STERNBERG *et al.* (2010), os níveis elevados de testosterona livre poderiam servir como biomarcadores da ação do TBT, sem um envolvimento causal no processo de imposex.

Outra hipótese levantada propõe uma ação neurotóxica do TBT, que causaria um aumento da secreção de neuro-hormônios que contribuem para a diferenciação sexual masculina em gastrópodes, como o neuropeptídeo APGWamida, um fator morfogênico do pênis. Porém, estudos mais recentes mostraram a ineficiência do APGWamida em induzir o imposex em *Bolinus brandaris*, o que enfraquece a hipótese (SANTOS *et al.* 2006).

Atualmente, a hipótese mais aceita considera o TBT como um agonista do receptor de retinóide X (RXR) que é um tipo de receptor nuclear, que ativa a transcrição na presença de um ligante.

O TBT é um ativador de alta afinidade do RXR, assim existem dois mecanismos pelo qual o TBT poderia estimular uma sinalização de forma aberrante do RXR

resultando em imposex: (A) sua ação direta ligando-se e ativando o RXR ou (B) agindo indiretamente através da inibição da acil coenzima A:aciltransferase (Figura 2).

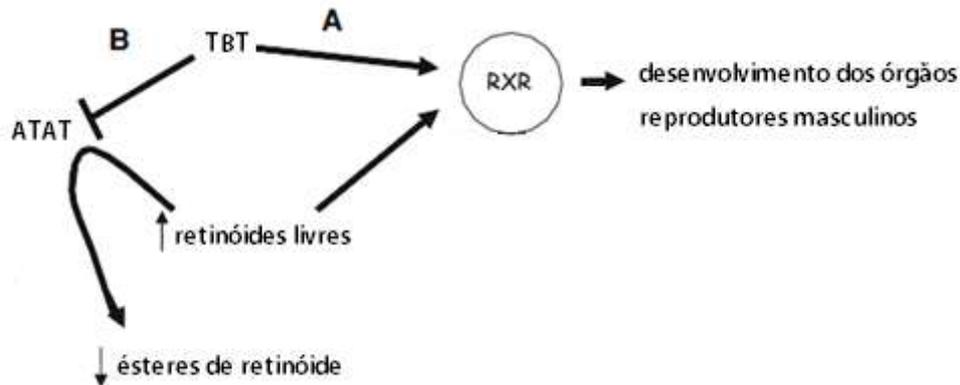


Figura 2. Mecanismo proposto para imposex induzido por TBT. TBT ativa o RXR sinalizando o início da transcrição de genes necessários para o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino (A) diretamente, ligando-se e ativando RXR; ou (B) indiretamente, inibindo acil coenzima A:aciltransferase (ATAT) resultando no aumento do nível de retinóide endógeno. RXR é então ativado pelo retinóide endógeno livre. (adaptado de STERNBERG *et al.* 2010)

Além da difícil compreensão do mecanismo de ação do TBT no desenvolvimento do imposex, existem ainda diversos outros fatores que atuam sobre o desenvolvimento normal do trato reprodutivo de moluscos, como fotoperíodo, nutrição, parasitismo e temperatura (STERNBERG *et al.* 2010). Além disso, a recrudescência é um fenômeno regulado sazonalmente em muitos gastrópodes (HOTCHKISS *et al.* 2008) o que pode, também, influenciar o desenvolvimento da síndrome nos diferentes períodos.

O imposex afeta primariamente espécies gonocóricas de Ortoastrópoda, especificamente caenogastrópodes mais derivados, no entanto, já foi descrito em algumas espécies mais basais (FIORONI *et al.* 1991; JANER *et al.* 2006). Seu impacto sobre a “aptidão” das populações de gastrópodes depende da estratégia reprodutiva das espécies (STERNBERG *et al.* 2010).

Os estudos envolvendo imposex se utilizam de alguns índices criados originalmente por GIBBS *et al.* (1987) para a espécie *Nucella lapillus*, que relacionam o tamanho médio do pênis das fêmeas afetadas com o dos machos da mesma área (RPSI) e o grau de desenvolvimento do vaso deferente em fêmeas (VDSI). O RPSI (“*relative penis size index*”) é um índice de quantificação que utiliza cálculos matemáticos baseados na relação entre as medidas dos comprimentos médios dos pênis de machos e

fêmeas afetadas, sendo obtido segundo a equação: $(\text{comprimento médio dos pênis dos machos})^3 / (\text{comprimento médio dos pênis das fêmeas})^3 \times 100$ (GIBBS e BRYAN, 1987; HUET *et al.*, 1996; MINCHIN e MINCHIN, 1997).

Este índice é mais utilizado para espécies com pênis mais robusto, fazendo uma aproximação ao volume real do órgão. Além disso, a aplicação desse índice tem se mostrado muito apropriada quando os níveis de imposex são elevados. Outro índice, o RPLI (“*relative penis length index*”) proposto por TAN (1997), é obtido pela equação: $(\text{comprimento médio dos pênis das fêmeas}) / (\text{comprimento médio dos pênis dos machos}) \times 100$. De um modo geral, esse índice é mais utilizado para quantificar o imposex em espécies com pênis naturalmente mais delgado e para áreas menos impactadas.

O VDSI (“*vas deferent sequence index*”) tem como base a observação de aspectos morfológicos e é caracterizado por seis estágios crescentes, de acordo com a formação do vaso deferente e do pênis nas fêmeas (GIBBS *et al.* 1987) (Tabela 1; Figura 3).

Tabela 1. Estágios desenvolvimento de imposex em *Nucella lapillus* segundo GIBBS *et al.* (1987).

Estágio	Características Observadas
I	Início da formação de um vaso deferente
II	Início do desenvolvimento de um pênis e crescimento do vaso deferente
III	Pequeno pênis totalmente formado e vaso deferente crescendo até este
IV	Vaso deferente ligado ao pênis, que está mais desenvolvido
V	Fêmea tornando-se estéril devido ao bloqueio da vulva
VI	Fêmeas que foram fecundadas antes do bloqueio da vulva morrem, pois as cápsulas de embriões ficam impedidas de serem liberadas pela abertura genital.

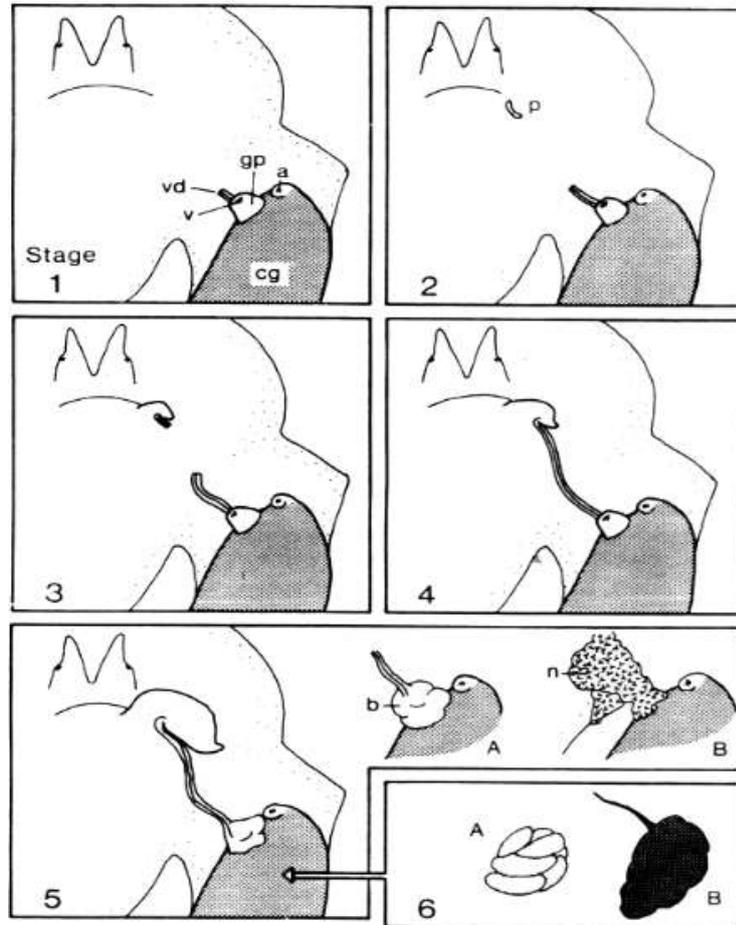


Figura 3. Estágios do desenvolvimento do pênis e do vaso deferente (VDSI) proposto por GIBBS *et al.* (1987) para *Nucella lapillus*.

Como nem todas as espécies se adequam ao índice proposto por GIBBS *et al.* (1987), várias escalas foram sendo desenvolvidas, tendo como base a escala inicialmente proposta (STEWART e MORA, 1992; EVANS *et al.*; 1995b; STROBEN *et al.* 1995; FERNANDEZ *et al.* 2002).

Em estudos posteriores, observou-se que em algumas espécies o início do imposex poderia não ocorrer pela formação do vaso deferente, mas pelo surgimento do pênis, demonstrando que o desenvolvimento imposex não obedece necessariamente a escala de VDSI proposta por GIBBS *et al.* (1987). Assim, uma nova escala foi proposta por STROBEN *et al.* (1995), que levava em consideração rotas alternativas de surgimento de pênis e vaso deferente para as espécies *Trivia arctica*, *Trivia monocha*, *Nucella lapillus*, *Ocenebra erinacea*, *Hinia encrassata* e *Hinia reticulata*.

Na escala de VDSI proposta por STROBEN *et al.* (1995), os estágios iniciais do imposex, (graus I, II e III na escala de GIBBS *et al.* 1987) podem seguir três diferentes

rotas: Na rota “a”, o grau I caracteriza-se pela presença de um pequeno pênis, no grau II, há o desenvolvimento de um ducto espermático e, no grau III, há o início do desenvolvimento do vaso deferente a partir do pênis em direção à abertura genital da fêmea. Na rota “b”, não há formação de pênis, o grau I é marcado pelo crescimento do vaso deferente na região próxima ao tentáculo direito, no grau II, há a proliferação do tecido formador do vaso deferente, a partir da abertura genital, e, no estágio III, o vaso deferente está totalmente formado. Na rota “c”, há primeiro a formação do vaso deferente nas proximidades da abertura genital caracterizando o grau I, o estágio II é marcado pela formação de um pequeno pênis e no grau III o pênis já está desenvolvido e com espermóduto formado (Figura 4).

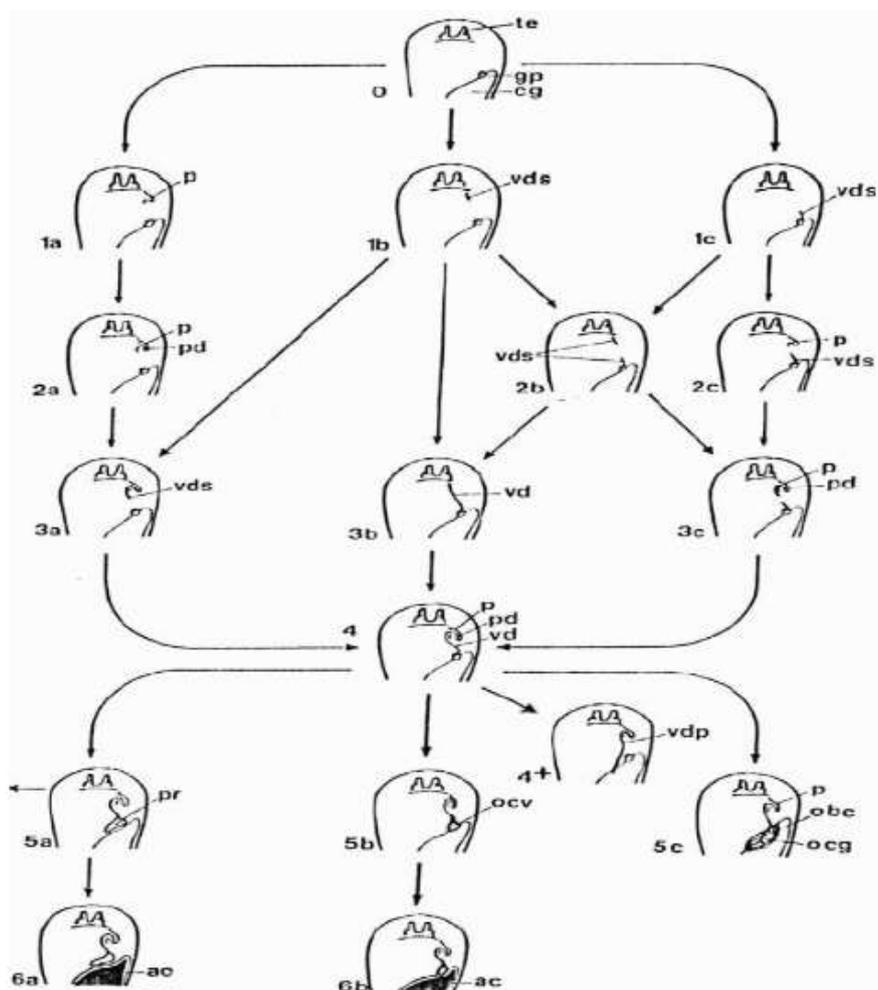


Figura 4. Escala de desenvolvimento do imposex segundo STROBEN *et al.* (1995). Legenda: ac, cápsulas abortadas; cg, glândula de cápsulas; gp, papila genital; obc, bolsa copulatória aberta; ocg, glândula de cápsulas aberta; ocv, oclusão da vulva; p, penis sem dutio espermático; pd, pênis com ducto espermático; pr, próstata; te, tentáculo; vd, vaso deferente; vdp, passagem do vaso deferente pela glândula de cápsulas; vds, seção do vaso deferente.

Uma outra adaptação à escala de VDSI de GIBBS *et al.* (1987) foi proposta por FERNANDEZ *et al.* (2002) para *Stramonita haemastoma*. Segundo esses autores, a escala de GIBBS *et al.* (1987) não se adequava perfeitamente à espécie, devido a difícil visualização do vaso deferente nesses organismos. A nova escala tem como base o tamanho do pênis e, quando possível, a observação do desenvolvimento do vaso deferente (Tabela 2).

Tabela 2. Estágios de VDSI propostos por FERNANDEZ *et al.* (2002) para *Stramonita haemastoma*.

ESTÁGIO	CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS
0	Fêmea normal
I	Início de formação do pênis (geralmente uma pequena papila) Início de formação do vaso deferente
II	Pênis formado com tamanho inferior a 2mm
III	Pênis com mais de 2mm e presença do vaso deferente
IV	Vaso deferente completamente formado
V	Vulva bloqueada pela proliferação do epitélio formador do vaso deferente
VI	Presença de uma massa escura composta por ovos abortados no interior da glândula de cápsulas

QUEIROZ *et al.* (2007) também propuseram uma nova escala de desenvolvimento do imposex (*Imposex Development Index - IDI*) para a espécie *S. haemastoma*, que prevê três rotas diferentes de desenvolvimento dos caracteres andróginos, com a presença de rotas afálicas (Figura 5).

Segundo estes autores, a rota “a” segue o desenvolvimento comumente registrado na literatura, com pênis e vaso deferente. Na rota “b”, há o início da formação do pênis, mas este permanece como uma pequena papila durante todo o desenvolvimento do imposex. Já na rota “c”, as fêmeas são afálicas.

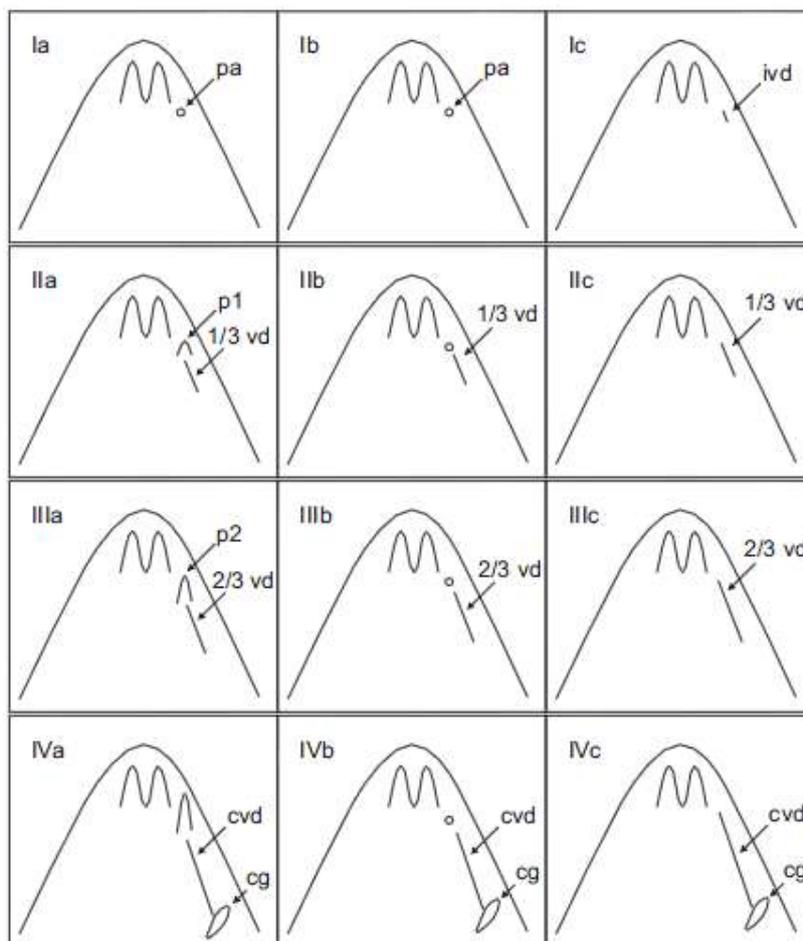


Figura 5. Escala de desenvolvimento do imposex (IDI) proposta para *Stramonita haemastoma*, detalhando rotas alternativas do desenvolvimento do pênis. Legenda: pa – papila; vdi – vaso deferente inicial; p1 – pênis inferior a 2mm; 1/3vd – vaso deferente com 1/3 do comprimento; p2 – pênis com mais de 2mm; 2/3vd – vaso deferente com 2/3 do seu comprimento; vdc – vaso deferente completo; gc – glândula da cápsula (QUEIROZ *et al.* 2007).

Outros parâmetros de avaliação do imposex também são utilizados. BARROSO *et al.* (2002) utilizaram o FPL (“*female penis length*”) que corresponde à média dos pênis de fêmeas, ao estudar a eficiência de compostos presentes em tintas antiincrustantes no desenvolvimento do imposex em *Nassarius reticulatus*. Este parâmetro, usualmente utilizado nos cálculos de RPLI e RPSI vem sendo utilizado com frequência em diversos estudos, proposto por STROBEN *et al.* (1996), em casos em que um VDSI elevado não gera informação sobre a intensidade do imposex em diferentes populações. O AOS (“*average oviduct stage*”), que corresponde ao estágio de convolução do oviduto foi utilizado em outros estudos com a mesma espécie (BARREIRO *et al.* 2001; SOUSA *et al.* 2005). Além destes, o %STER (“*percentage of sterile females*”) corresponde à porcentagem de fêmeas carregando cápsulas abortadas

dentro da glândula da cápsula, que também foi empregado por SOUZA *et al.* (2005) para avaliar o nível de imposex em populações ao longo da costa portuguesa.

A porcentagem de fêmeas com imposex em uma população também é utilizada como um índice para avaliar a contaminação por organoestênicos.

Uma nova abordagem, proposta por FERNANDEZ *et al.* (2007) utiliza narcotização reversível e um critério estatístico baseado na proporção sexual, para avaliar o grau de imposex na população, em vez de usar os índices usuais, que se baseiam na avaliação de animais sacrificados, que podem resultar na redução das populações.

Além disso, vêm sendo utilizadas, cada vez mais, análises químicas das concentrações de COEs em tecidos animais, água e sedimento, associadas ao estudo de imposex, na avaliação da contaminação por estes compostos (FOLSVIK *et al.* 1999; BHOSLE *et al.* 2004; PELIZZATO *et al.* 2004; WADE *et al.* 2004).

1.4 Imposex e biomonitoramento

O imposex já foi relatado em pelo menos 119 espécies de gastrópodes (CASTRO *et al.* 2007a) e várias delas vêm sendo sistematicamente utilizadas como indicadores biológicos da contaminação por compostos organoestênicos.

No Japão, por exemplo, espécies da família Thaididae têm sido utilizadas em mapeamentos de zonas contaminadas, tendo sido verificadas altas concentrações de TBT, TPT e seus derivados em amostras de tecidos, água e sedimentos (HORIGUCHI *et al.* 1994 e 1997). Estudos similares foram realizados em diversos países, sempre correlacionando os níveis de imposex com a distância das possíveis fontes de contaminação e com a concentração de TBT nos sedimentos, água ou nos tecidos dos animais (CURTIS, 1994; LIU e SUEN, 1996; STEWART e THOMPSON, 1997; BECH, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2002; CASTRO *et al.* 2005).

Na Europa, espécies como *Nucella lapillus*, *Buccinum undatum*, *Neptunea antiqua*, *Ocenebra erinacea*, *Nassarius reticulatus* e *Littorina littorea* tem sido utilizadas como bioindicadores de poluição por TBT em áreas do Atlântico e do Mar do Norte (RODRIGUEZ *et al.* 2009)

No Brasil, o imposex já foi relatado em pelo menos 9 espécies, *Stramonita haemastoma*, no litoral de São Paulo, Ceará, e Rio de Janeiro (MAGALHÃES *et al.*

1997; CASTRO *et al.* 2000; FERNANDEZ *et al.* 2002; FERNANDEZ *et al.* 2005b), *Stramonita rustica*, nos estados de Alagoas e Rio Grande do Norte (CAMILLO *et al.* 2004; CASTRO *et al.* 2004), *Olivancillaria vesica*, *Leucozonia nassa* e *Cymatium parthenopeum* todos no litoral do Rio de Janeiro (CAETANO e ABSALÃO, 2003; CASTRO *et al.* 2007b), *Pugilina morio*, *Voluta ebraea* e *Nassarius vibex* no litoral do Ceará (AZEVEDO, 2008; CASTRO *et al.* 2008; CARDOSO *et al.* 2009; LIMA-VERDE *et al.* 2010) e *Thais deltoidea* no Espírito Santo (COSTA *et al.* 2008).

Algumas dessas espécies têm sido amplamente utilizadas para fins de monitoramento de áreas contaminadas por organoestênicos na costa brasileira. No nordeste, por serem as espécies mais abundantes, *S. haemastoma* e *S. rustica* são as mais apropriadas para este fim (CASTRO *et al.* 2000; CAMILLO *et al.* 2004; CASTRO *et al.* 2004).

Em algumas espécies, os efeitos da contaminação manifestados em níveis elevados de imposex podem ser suficientemente graves para causar esterilização das fêmeas através de malformações como o bloqueio da vulva (DEMAINTENON, 2000), podendo levar a um declínio populacional, como ocorreu com populações de *Nucella lapillus* na costa da Inglaterra (BRYAN *et al.* 1986), *Buccinum undatum* no mar do Norte (ten HALLERS-TJABBES *et al.*, 1996). *Ocenebrina aciculata*, na França (OEHLMANN *et al.* 1996) e *Acanthina monodon*, no Chile central (OSÓRIO e HUAQUÍN, 2003).

No entanto, com a implantação de medidas restritivas ao longo dos anos e o completo banimento do uso do TBT em tintas antiincrustantes em 2008, alguns estudos têm sido realizados demonstrando que a contaminação por compostos orgânicos de estanho tem diminuído, especialmente em amostras de água e tecidos animais (HORIGUCHI *et al.* 2003; CHOI *et al.* 2009; RUIZ *et al.* 2008 e 2010).

Pesquisas baseadas no imposex têm demonstrado, em geral, uma redução dos índices como a porcentagem de fêmeas afetadas, RPLI, RPSI e VDSI. Na Nova Zelândia, poucos anos após a implantação das restrições, as populações da espécie *Lepsiella scorbina* exibiram uma queda significativa dos índices observados (SMITH, 1996). Diminuição significativa dos índices também foi observada para populações de *Nucella lapillus* no Mar do Norte (EVANS *et al.* 1996) e Islândia (JORUNDSDÓTTIR *et al.* 2005). A eficácia da legislação proibitiva sobre o TBT foi testada na Europa por SOUSA *et al.* (2009), através da comparação de índices obtidos em 2003 e 2008,

demonstrando também uma melhora desses índices em populações de *Nassarius reticulatus*.

Alguns trabalhos, no entanto, têm demonstrado um aumento dos índices de imposex em algumas áreas relacionando estes resultados à realização de dragagens de sedimentos em áreas contaminadas e sua incorreta disposição no ambiente, estes sedimentos podendo ser remobilizados para áreas costeiras causando recontaminação, bem como a falta de destinação para os resíduos de tintas antiincrustantes retiradas durante a limpeza de navios nos estaleiros (SWENNEN *et al.* 2009).

1.5 Uso de bioindicadores

O uso de macroinvertebrados em programas de biomonitoramento possui várias vantagens, enumeradas por MORENO e CALLISTO (2004):

1. são cosmopolitas e abundantes;
2. a maioria possui características ecológicas bem conhecidas;
3. são sedentários (ou com mobilidade restrita) sendo representativos de condições locais;
4. são bentônicos, permitindo a associação com as condições do sedimento;
5. alguns permitem avaliar o nível de impacto através de bioacumulação e biomagnificação;
6. têm a vantagem de caracterizar a qualidade das águas não apenas no instante de sua coleta, mas refletindo também sua situação em um período de tempo consideravelmente mais longo, permitindo avaliar os efeitos de um poluente de forma segura e precisa em diferentes escalas temporais.

Os moluscos, principalmente gastrópodes e bivalves, são poderosos sistemas modelo para o estudo de toxicologia ambiental (RITTSCHOF & McCLELLAN-GRENN, 2005) pelo modo de vida sésil e sedentário de muitos adultos, o que permite estudos de bioacumulação e biomagnificação de poluentes (WESTON & MARUYA, 2002). Assim, estudos baseados no desenvolvimento do imposex, entre outros, são importantes ferramentas no monitoramento das condições ambientais.

Além do imposex, outras respostas fisiológicas como SFG (“*scope for growth*”), que é uma medida de energia disponível para o animal, e a relação entre consumo de oxigênio e excreção de nitrogênio (O:N), que é uma medida da utilização relativa de proteína no metabolismo energético, também podem ser utilizadas como biomarcadores fisiológicos tanto de acúmulo de TBT quanto de sua depuração, podendo servir como ferramentas importantes no biomonitoramento (CHAN *et al.* 2008). Uma baixa proporção O:N, menor que 20, representa uma alta taxa de catabolismo de proteínas e tem sido considerada como indicadora de condição estressante, sendo uma relação maior que 20, representativa de uma condição saudável.

Experimentos de indução do imposex em condições de laboratório também têm sido realizados como forma de elucidar o mecanismo de indução do TBT e outros compostos, bem como para definir os estágios de desenvolvimento da síndrome (HORIGUCHI *et al.* 1995; HUET *et al.* 1995; MENSINK *et al.* 2002; McCLELLAN-GREEN *et al.* 2006; LIMAVERDE *et al.* 2007).

1.6 Stramonita haemastoma

A espécie *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767), da família Muricidae (Gastropoda: Prosobranchia) é popularmente chamada de “saquarítá” e possui representantes em toda costa atlântica das Américas, além de ser encontrada na costa leste do Atlântico, desde o mar Mediterrâneo até o oeste da África (RIOS, 1994), onde habitam a zona intertidal (Figura 6).

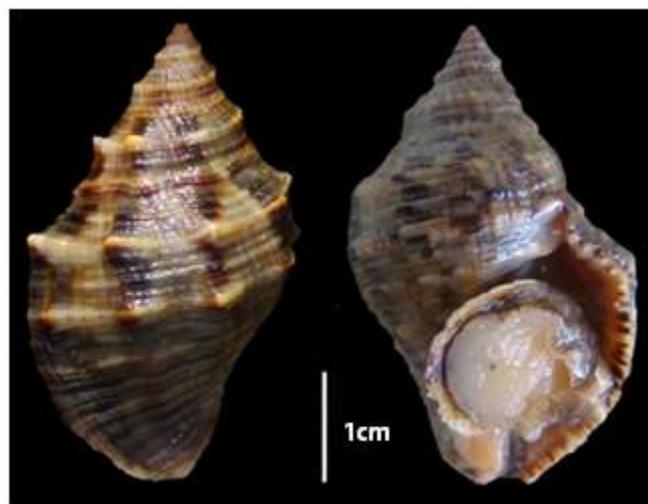


Figura 6. Vista dorsal e ventral de um exemplar de *Stramonita haemastoma* (Foto: Deyse Azevedo)

É uma espécie dióica, apresenta fertilização interna (KOOL, 1993) e formação de grupos para ovoposição (PAPP e DUARTE, 2001), sua reprodução ocorrendo nos meses mais quentes do ano. Seu estágio larval é planctotrófico e de longa duração, podendo chegar a três meses (ROLLER e STICKLE, 1988) o que permite uma maior capacidade de dispersão (TODD *et al.* 1998). (ver BUTLER 1985 para uma revisão sobre a biologia da espécie).

Até o momento, duas subespécies já foram descritas, sendo elas *Stramonita haemastoma haemastoma* (Linnaeus, 1767) e *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837). Segundo UDELSMANN (2009), há certa controvérsia taxonômica dentro da espécie *S. haemastoma* devido sua ampla distribuição, o que faz com que já tenha sido descrita diversas vezes, possuindo diversos nomes sinônimos.

Um estudo recente, inclusive, questiona a presença da espécie *S. haemastoma* na costa brasileira, estando esta restrita à Europa e África, sendo a espécie aqui encontrada, uma nova espécie chamada *Stramonita brasiliensis* (CLAREMONT *et al.* 2011). No entanto, no presente estudo optou-se por utilizar a denominação *S. haemastoma*.

Entre as mais de 100 espécies listadas até o momento como exibidoras de imposex, 38 pertencem à família Muricidae (ELLIS e PATTISINA, 1990; FIORONI *et al.* 1991; STEWART *et al.* 1992; STEWART e MORA, 1992; EVANS *et al.* 1995b; TESTER *et al.* 1996; HORIGUSHI *et al.* 1997a e 1997b), fazendo dessa família o táxon mais utilizado como bioindicador da contaminação por COEs no mundo.

Por ser encontrada em diversas regiões da costa brasileira, a espécie *S. haemastoma* tem sido bastante utilizada em estudos de monitoramento, mostrando-se como uma espécie útil e de fácil avaliação.

Além de sua importância como bioindicador de contaminação por COEs, *S. haemastoma* tem importância econômica em algumas regiões, sendo explorada de forma predatória em costões e áreas próximas a cultivos, chegando a ter um valor de 7 reais o quilo sem concha (MANZONI e LACAVA, 1998). Segundo MANZONI e LACAVA (1998), a espécie possui um elevado potencial para ser cultivada, atingindo tamanho de consumo entre 6 e 7 meses, e apresentando alta taxa de sobrevivência.

1.7 Hipóteses de trabalho e objetivo geral

Tendo em vista o exposto, o presente estudo considerou as seguintes hipóteses de trabalho:

1. Com o banimento mundial do uso de tintas antiincrustantes à base de compostos orgânicos de estanho espera-se que haja uma redução nos índices de quantificação do imposex.
2. O TBT é capaz de promover alterações morfológicas em *S. haemastoma* em condições de laboratório, sendo possível acompanhar o desenvolvimento da síndrome ao longo do tempo.

Sendo assim, esta pesquisa teve por objetivo avançar o conhecimento sobre o imposex em populações de *S. haemastoma* no estado do Ceará, realizando reavaliação de áreas na costa de Fortaleza e região metropolitana previamente estudadas e verificando as alterações morfológicas promovidas pela indução do imposex em laboratório.

Capítulo I: Reavaliação do imposex em *Stramonita haemastoma* na região metropolitana de Fortaleza, Ceará – Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os níveis de contaminantes no ambiente marinho têm aumentado, como consequência direta das atividades antropogênicas.

Por este motivo, cresce cada vez mais a necessidade de desenvolver métodos para a identificação, avaliação e gestão dos riscos decorrentes de descargas de poluentes no ambiente.

Segundo CAJARAVILLE *et al.* (2000), organizações internacionais e agências ambientais têm reconhecido que uma avaliação de risco ao meio ambiente não pode ser feita exclusivamente com base na análise química de amostras ambientais, porque essa abordagem não fornece qualquer indicação dos efeitos deletérios de contaminantes sobre a biota. Desta forma, a medição dos efeitos biológicos de poluentes é de grande importância para a avaliação da qualidade do ambiente (GRAY, 1992). Nesse sentido, a utilização de biomarcadores e indicadores biológicos para o monitoramento ambiental tem sido defendida com base na sua relevância ecológica.

Dentre os compostos introduzidos no ambiente marinho, os organoestânicos como o TBT e TPT têm sido considerados os mais tóxicos, e muitos estudos têm demonstrado a relação entre a presença desses compostos em águas costeiras e os efeitos nocivos à biota (ALZIEU *et al.*, 1982, SIDHARTHAN *et al.* 2002; KWOK & LEUNG 2005).

As áreas portuárias são as mais afetadas por esse tipo de composto, visto sua ampla utilização durante muitos anos como agente biocida em tintas antiincrustantes. No entanto, compostos orgânicos de estanho também têm sido utilizados em diversas aplicações industriais e agrícolas, podendo afetar tanto ambientes terrestres, quanto marinhos.

No ambiente marinho, com a descoberta da relação entre a presença de COEs e o desenvolvimento de imposex em gastrópodes, a síndrome passou a ser amplamente utilizada como um bioindicador da contaminação por esses compostos, sendo utilizado em diversos programas de monitoramento de áreas sob influência de terminais

portuários, marinas, estaleiros etc (MORCILLO E PORTE, 1998; BECH, 2002; CAO *et al.* 2009).

Diversos estudos têm demonstrado de forma clara a relação entre os níveis de imposex encontrados em populações de gastrópodes e a distância a áreas portuárias ou outras fontes de organoestânicos (CURTIS, 1994; LIU & SUEN, 1996; BECH, 2002; CASTRO, 2005, 2007; LIMA-VERDE, 2010).

Devido a seus efeitos adversos, desde a década de 80 o uso de compostos como o TBT tem sido regulado em diversos países. Uma Convenção Internacional sobre Controle de Sistemas Anti-incrustante da Organização Marítima Internacional, adotada em 2001, estabeleceu diversas metas para o banimento mundial do uso do TBT como anti-incrustante. Desde 2003 já existe a proibição da aplicação ou reaplicação de tintas a base de COEs em todos os navios. A última data para o completo banimento adotada pela Convenção foi janeiro de 2008 e foi ratificada por inúmeros países, que se comprometeram a banir a aplicação de TBT em todos os seus navios, assim como proibir a entrada, em seus portos, de embarcações que contenham tal composto em seus cascos (IMO, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que medidas restritivas têm levado a uma diminuição dos níveis de contaminação ambiental por COEs e, conseqüentemente, a uma melhora nos índices de imposex (SMITH, 1996; HORIGUCHI *et al.* 2003; SOUSA *et al.* 2009). No entanto, mesmo com a relativa melhora, compostos organoestânicos ainda são detectados em amostras de água, sedimento e biota, demonstrando sua persistência no ambiente.

Em algumas áreas, já foi observado, inclusive, um aumento da contaminação, que pode estar relacionado ao descumprimento de acordos de não-utilização desses compostos. Segundo CAO *et al.* (2009), apesar da tendência global em banir seu uso, apenas algumas regiões da Ásia têm restrições a esses produtos, chegando a China a consumir cerca de 7500ton/ano de organoestânicos. Além disso, pode ocorrer recontaminação ocasionada por dragagens ou destinação incorreta de material contaminado retirado dos navios (SWENNEN *et al.* 2009).

Apesar disso, alguns anos após a regulamentação de seu uso como agente biocida, espera-se que haja uma diminuição dos efeitos nocivos à biota, no entanto, ainda é necessário que hajam estudos para comprovar a efetividade desse banimento. Desta forma, o monitoramento de áreas costeiras é de grande importância para avaliar o nível de contaminação ocasionado pelo TBT e seus derivados, em uma escala temporal.

2. OBJETIVO

- Avaliar o imposex em *S. haemastoma* na costa de Fortaleza;
- Comparar os níveis de imposex em populações de *S. haemastoma* na área sob influência do Terminal Portuário do Mucuripe, com o estudo realizado por CASTRO *et al.* 2007c.

3. METODOLOGIA

3.1 Área de estudo - Terminal Portuário do Mucuripe

Construído no ano de 1933, o Porto do Mucuripe (Figura 7) ocupa uma área de 27 hectares (incluindo os 15 hectares da Praia Mansa) e é um dos terminais marítimos mais importantes e estratégicos do País. Com cerca de 1050m de cais acostável e localização privilegiada, (na enseada do Mucuripe, em Fortaleza, Ceará), mantém proximidade com os mercados da América do Norte e Europa, permitindo o atendimento a empresas de navegação com linhas regulares destinadas a portos dos Estados Unidos, Canadá, América Central, Caribe, Europa, África e países do Mercosul, além de itinerários para os demais portos brasileiros através da navegação de cabotagem (CIA DOCAS DO CEARÁ, 2011).

O terminal portuário passa atualmente por um processo de dragagem que consiste no aprofundamento do canal de acesso e bacia de evolução dos atuais 10,5 metros para 14 metros e alargamento de 150 para 160 metros dos canais de acesso interno e externo. A obra irá retirar um total de 5.947.245m³ de sedimento, e deverá ser concluída em junho de 2011. Com a dragagem, o terminal portuário do Mucuripe, que já começou 2011 com recorde de movimentação de mercadorias de 4,2 milhões de toneladas, terá sua capacidade de carga ampliada em 30% (CIA DOCAS DO CEARÁ, 2011).



Figura 7. Imagem aérea do Terminal Portuário do Mucuripe (Fonte: Cia Docas do Ceará, 2011)

3.2 Biomonitoramento

Um estudo prévio, em 2004/2005, realizou um levantamento do imposex nas áreas sob influência de terminais portuários em toda a costa do Nordeste (CASTRO *et al.*, 2007c). No presente estudo, a área sob influência do terminal portuário do Mucuripe, no estado do Ceará, foi reavaliada a fim de verificar o estado atual da contaminação por compostos orgânicos de estanho, através dos índices de quantificação do imposex.

No estudo de CASTRO *et al.* (2007c), foram determinados 12 pontos de coleta com base na presença de moluscos muricídeos do gênero *Stramonita* e nas correntes costeiras predominantes. No presente estudo, foram realizadas coletas nos mesmos locais georeferenciados no estudo de CASTRO *et al.* (2007c), no entanto, em apenas 11 estações dada a ausência de espécimes em uma das estações (Tabela 3).

As coletas foram feitas manualmente sempre em marés baixas diurnas e, em cada ponto, pelo menos 30 animais foram coletados.

Os animais foram acondicionados em recipientes plásticos com água do local de coleta e levados para o laboratório, onde permaneceram em aquários com aeração constante até o momento de cada análise.

Tabela 3. Georreferenciamento das estações de coleta na área de influência do Terminal Portuário do Mucuripe utilizadas por Castro *et al.* (2007c) e no presente estudo.

LOCAL	ESTAÇÃO	LATITUDE	LONGITUDE
Praia do Pacheco	E1	38° 37' 45" S	03° 41' 09" W
Praia de Iparana	E2	38° 37' 03" S	03° 41' 13" W
Praia de Dois Coqueiros	E3	38° 36' 45" S	03° 41' 21" W
Praia da Barra	E4	38° 35' 15" S	03° 41' 54" W
Praia Formosa	E5	38° 32' 40" S	03° 42' 53" W
Poço da Draga	E6	38° 31' 02" S	03° 43' 06" W
Praia do Ideal	E7	38° 30' 07" S	03° 35' 56" W
Praia Mansa	E8	38° 28' 34" S	03° 42' 12" W
Praia do Titã	E9	38° 28' 02" S	03° 42' 28" W
Caça e Pesca	E10	38° 26' 18" S	03° 45' 54" W
Praia da Sabiaguaba	E11	38° 25' 54" S	03° 46' 27" W

3.3 Avaliação do imposex

Os animais coletados foram levados ao Laboratório de Zoobentos do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará para análises. Estes foram narcotizados com solução salina de $MgCl_2$ 3,5% (HUET *et al.* 1995), até não oferecerem resistência ao manuseio e então analisados para a presença de estruturas morfológicas características do imposex.

Os animais tiveram suas conchas medidas da ponta da espira até a extremidade do canal sifonal com auxílio de um paquímetro, e então suas conchas foram removidas com auxílio de martelo e/ou torno de bancada (morsa).

A determinação sexual foi feita através da presença do receptáculo seminal presente unicamente em fêmeas (Figura 8). Os pênis de machos e fêmeas afetadas pelo imposex foram medidos com paquímetro de precisão de 0,05mm, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Para fins de cálculos matemáticos, foram tomadas as medidas de pênis mais precisas possíveis e papilas muito difíceis de mensurar foram consideradas como pênis de 0,1mm de comprimento.

Foram utilizados os índices RPLI (*relative penis length index*), calculado segundo TAN (1997), FPLI (*female penis length index*), que corresponde ao comprimento médio do pênis das fêmeas afetadas pela síndrome, e o VDSI (*vas deferens sequence index*), seguindo a escala proposta por GIBBS *et al.* (1987) e modificada por FERNANDEZ *et al.* (2002) para a espécie *S. haemastoma*.



Figura 8. Partes moles de fêmea de *S. haemastoma*, evidenciando o receptáculo seminal. RS: receptáculo seminal. (Foto: Deyse Azevedo)

3.4 Análises estatísticas

Foi utilizada uma regressão linear utilizando os dados das campanhas de 2004/2005 (CASTRO *et al.* 2007c) e 2010/2011 (presente estudo) para avaliar a relação entre o tamanho das conchas e dos pênis dos animais. A avaliação dessa relação é importante uma vez que comparações temporais podem ser influenciadas pelo tamanho diferenciado dos animais em diferentes campanhas.

A normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade através do teste de Levene. Os resultados destes testes indicaram que os dados não cumprem os pré-requisitos para realização de testes paramétricos, assim a comparação entre os tamanhos das conchas dos organismos obtidos nas campanhas de 2004/2005 e 2010/2011 foi realizada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney (teste U).

Os dados de FPLI, RPLI e VDSI foram comparados, de forma conjunta para as 11 estações, através do teste pareado de Wilcoxon. Posteriormente, os dados de FPLI e VDSI foram comparados para cada estação através do teste Mann-Whitney (Teste U). Para esse teste, não foram avaliadas as estações E10 e E11, por não apresentarem dados de imposex em ambas as campanhas.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 6.0.

4 RESULTADOS

Foram monitoradas 11 estações na costa de Fortaleza e região metropolitana consideradas sob influência do terminal portuário do Mucuripe (Tabela 4), nas quais foi coletado um total de 464 animais. Oito estações apresentaram imposex em algum nível e apenas três não apresentaram qualquer sinal da síndrome. Comparativamente à campanha 2004/2005, houve redução da incidência de imposex em todas as estações avaliadas na campanha 2010/2011, com exceção da estação da praia Mansa (E8), que ainda apresentou 100% de fêmeas afetadas pela síndrome.

Os índices mais elevados foram observados na mesma estação (E8) e diminuíram à medida que as estações eram mais afastadas do porto, assim como a porcentagem de fêmeas apresentando a síndrome (Figura 9). Também na praia Mansa (E8), foram coletados os maiores indivíduos deste estudo, não tendo sido observados animais jovens durante a coleta. Nesta estação, foram observadas as fêmeas em estágio mais avançado de VDSI (estágio V), apresentando a vulva bloqueada pelo tecido formador do vaso deferente.

A praia de Iparana (E2) foi considerada o limite leste da ocorrência de imposex. A oeste do porto, apenas a população da praia do Titã (E9) apresentou sinais indicativos de imposex, no entanto com níveis muito baixos.

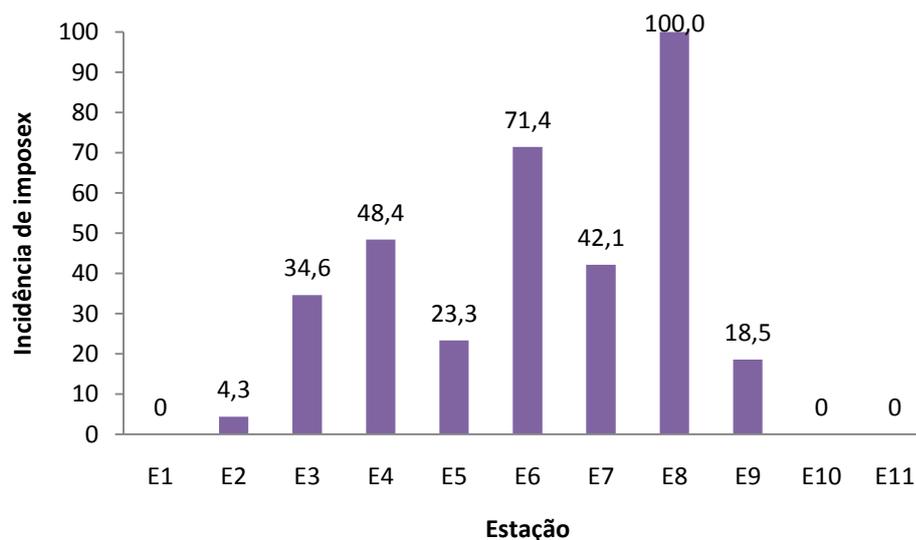


Figura 9. Percentual de ocorrência de imposex nas populações de *Stramonita haemastoma* coletadas nas 11 estações avaliadas na região metropolitana de Fortaleza, Ceará.

Tabela 4. Índices de imposex em *Stramonita haemastoma* coletadas na costa da região metropolitana de Fortaleza, sob a influencia do Terminal Portuário do Mucuripe no período de Nov/2010 a Fev/2011. N: número amostral; ♂/♀: machos/fêmeas; FPLI (\pm DP): *female penis length index* (\pm desvio padrão); RPLI: *relative penis length index*; VDSI (\pm DP): *vas deferens sequence index* (\pm desvio padrão).

Local / Estação	N	♂/♀	%I	FPLI (\pmDP)	RPLI	VDSI (\pmDP)
Praia do Pacheco (E1)	39	9/30	0	0	0	0
Praia de Iparana (E2)	43	20/23	4,34%	0,004 (\pm 0,02)	0,09	0,04 (\pm 0)
Praia de Dois Coqueiros (E3)	55	28/26	34,61%	0,12 (\pm 0,26)	2,70	0,38 (\pm 0,2)
Praia da Barra (E4)	54	21/33	48,48%	0,29 (\pm 0,44)	4,58	0,75 (\pm 0,6)
Praia Formosa (E5)	53	23/30	23,33%	0,26 (\pm 0,15)	10,92	0,26 (\pm 0,9)
Poço da Draga (E6)	28	14/14	71,42%	0,31 (\pm 0,55)	7,25	0,92 (\pm 0,5)
Praia do Ideal (E7)	39	20/19	42,10%	0,09 (\pm 0,25)	2,80	0,47 (\pm 0,8)
Praia Mansa (E8)	30	12/18	100%	2,31 (\pm 0,86)	23,99	4,22 (\pm 0,6)
Praia do Titã (E9)	46	18/27	18,51%	0,01 (\pm 0,04)	0,81	0,18 (\pm 0,5)
Caça e pesca (E10)	39	18/21	0	0	0	0
Praia da Sabiaguaba (E11)	38	13/25	0	0	0	0

Foi observada correlação positiva entre o tamanho da concha e o comprimento do pênis de machos e fêmeas afetadas pelo imposex (Figura 10).

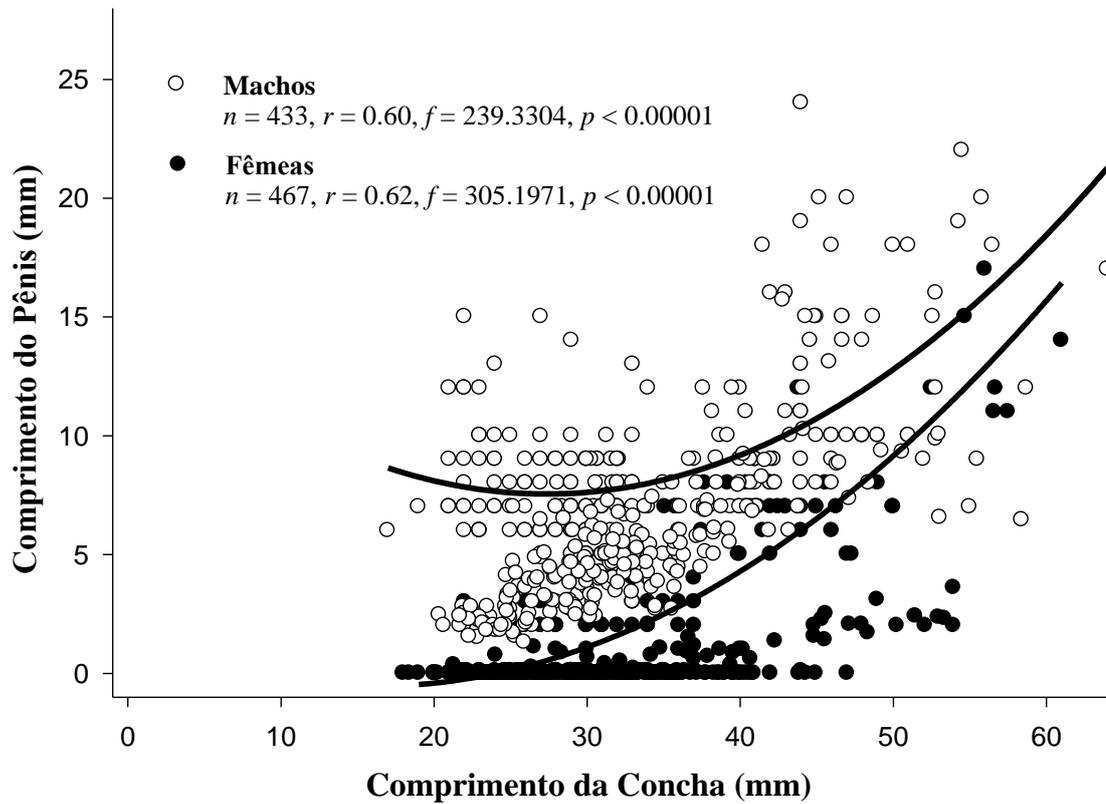


Figura 10. Relação entre comprimento da concha e pênis em machos e fêmeas com imposex de *S. haemastoma* coletados na costa da região metropolitana de Fortaleza, Ceará.

O teste U (Mann-Whitney) revelou diferença significativa ($p < 0.05$) entre o tamanho das conchas das campanhas 2004/2005 e 2010/2011, para todas as estações, com exceção da praia do Pacheco (E1) (Figura 11).

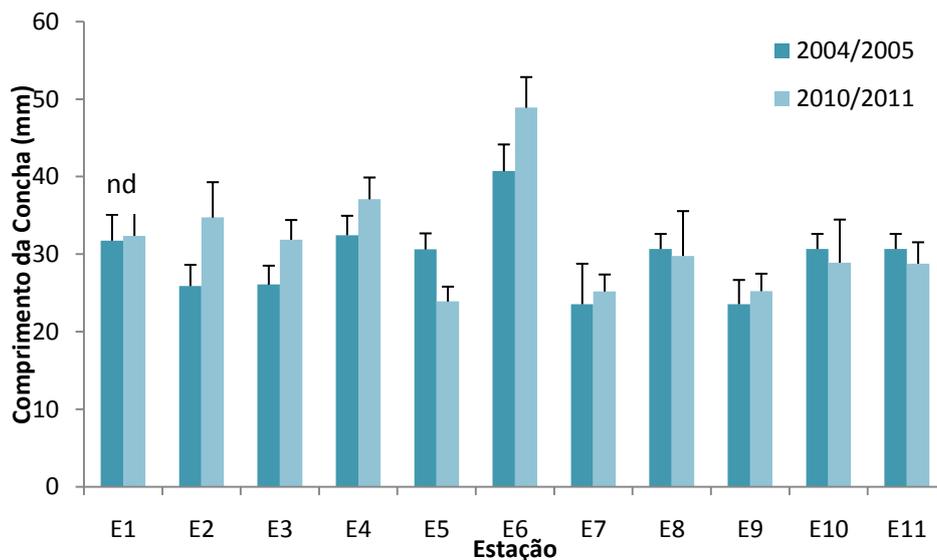


Figura 11. Tamanho médio das conchas (machos+fêmeas) dos exemplares de *S. haemastoma* coletados na costa da região metropolitana de Fortaleza - Ceará, nas campanhas 2004/2005 e 2010/2011. nd: não houve diferença.

Todos os índices obtidos na atual campanha foram menores que os obtidos na campanha 2004/2005 (Figura 13)

As 11 estações foram avaliadas de forma conjunta pelo teste pareado de Wilcoxon com relação ao VDSI e a diferença entre as duas campanhas foi significativa ($p = 0.007$). (Figura 12). O teste Mann-Whitney realizado para cada estação revelou diferença significativa para todas as estações com exceção da estação E6 (Poço da Draga) (Tabela 5).

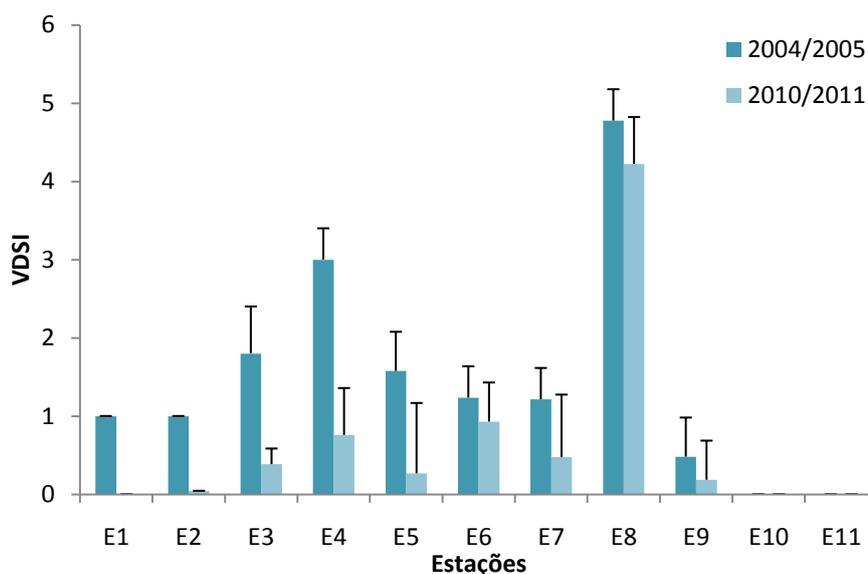


Figura 12. Comparação do VDSI de *S. haemastoma* na costa de Fortaleza nas campanhas 2004/2005 e 2010/2011.

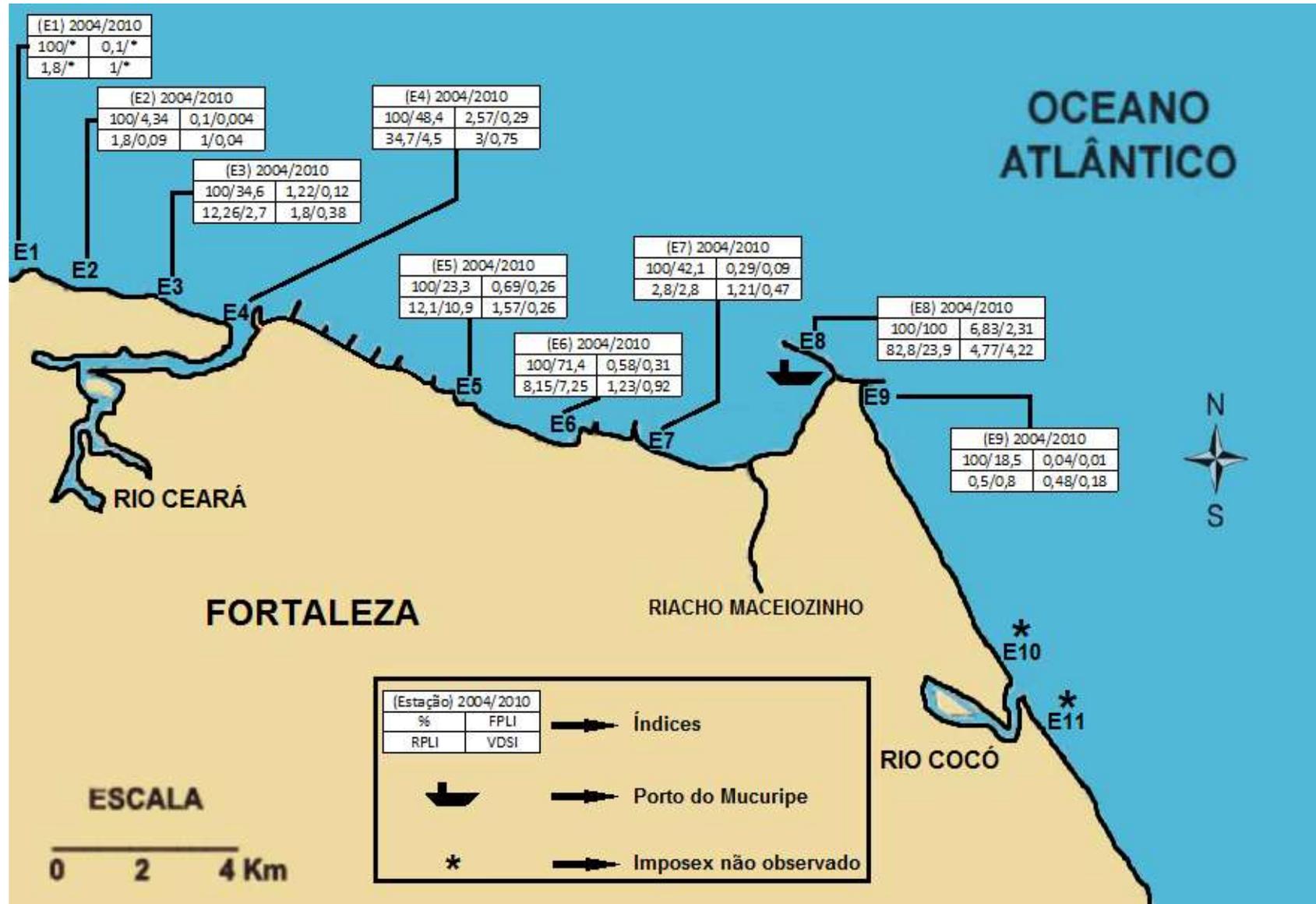


Figura 13. Resultados do monitoramento realizado na costa da região metropolitana de Fortaleza sob a influência do terminal Portuário do Mucuripe nos anos de 2004/2005 (Castro et al, 2007c) e 2010/2011 (presente estudo) utilizando a espécie *S. haemastoma*.

Tabela 5. Comparação do VDSI e FPLI em *Stramonita haemastoma* na costa da região metropolitana de Fortaleza, sob a influência do Terminal Portuário do Mucuripe observado nas campanhas de 2004 e 2010 (teste Mann-Whitney).

Local / Estação	VDSI (\pmDP) (2004)/(2010)	FPLI (\pmDP) (2004)/(2010)	Teste U (p) VDSI / FPLI	Significância (ambos)
Praia do Pacheco (E1)	1 (\pm 0) / 0	0,1 (\pm 0) / 0	<0.0001 / <0.0001	Significativo
Praia de Iparana (E2)	1 (\pm 0) / 0,04 (\pm 0)	0,1 (\pm 0) / 0,004 (\pm 0,02)	<0.0001 / <0.0001	Significativo
Praia de Dois Coqueiros (E3)	1,8 (\pm 0,61) / 0,38 (\pm 0,2)	1,22 (\pm 0,9) / 0,12 (\pm 0,26)	<0.0001 / <0.0001	Significativo
Praia da Barra (E4)	3 (\pm 0,42) / 0,75 (\pm 0,6)	2,57 (\pm 0,9) / 0,29 (\pm 0,44)	<0.0001 / <0.0001	Significativo
Praia Formosa (E5)	1,57 (\pm 0,5) / 0,26 (\pm 0,9)	0,69 (\pm 0,6) / 0,26 (\pm 0,15)	<0.0001 / <0.0001	Significativo
Poço da Draga (E6)	1,23 (\pm 0,43) / 0,92 (\pm 0,5)	0,58 (\pm 1) / 0,31 (\pm 0,55)	0.06 / 0.08	Não-significativo
Praia do Ideal (E7)	1,21 (\pm 0,42) / 0,47 (\pm 0,8)	0,29 (\pm 0,4) / 0,09 (\pm 0,25)	0.017 / 0.014	Significativo
Praia Mansa (E8)	4,77 (\pm 0,42) / 4,22 (\pm 0,6)	6,83 (\pm 0,9) / 2,31 (\pm 0,86)	<0.0001 / 0.0043	Significativo
Praia do Titã (E9)	0,48 (\pm 0,5) / 0,18 (\pm 0,5)	0,04 (\pm 0,1) / 0,01 (\pm 0,04)	0.03 / 0.03	Significativo
Caça e pesca (E10)	0 / 0	0 / 0	-	Não avaliado
Praia da Sabiaguaba (E11)	0 / 0	0 / 0	-	Não avaliado

Com relação ao FPLI, o resultado do teste pareado de Wilcoxon também revelou diferença significativa ($p=0.007$) entre as campanhas. Segundo o resultado do teste Mann-Whitney, houve diferença significativa entre todas as estações avaliadas, com exceção da estação E6 (Poço da Draga) (Figura 14), assim como para o VDSI.

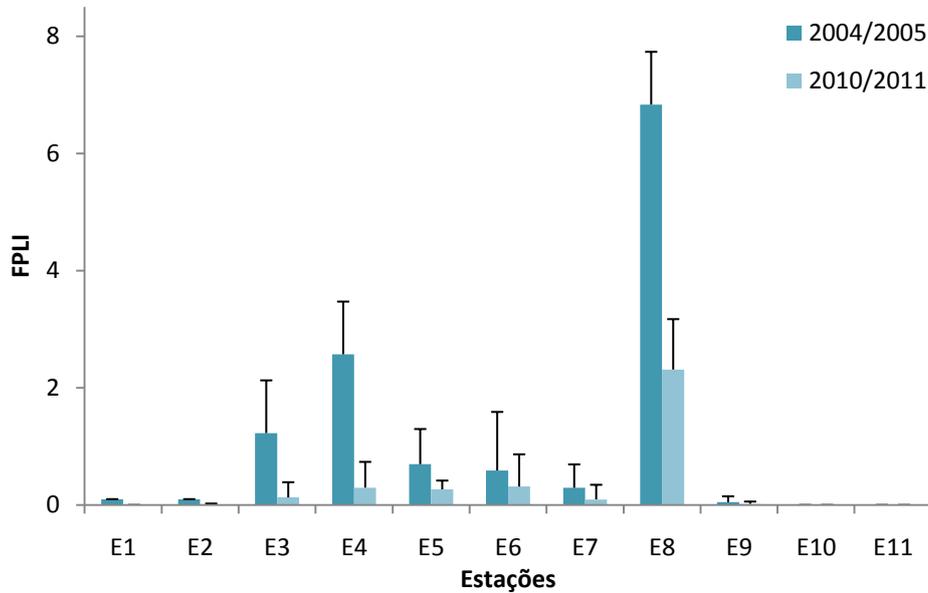


Figura 14. Gráfico comparativo entre FPLI em *S. haemastoma* nas campanhas 2004/2005 e 2010/2011.

O RPLI também apresentou diferença significativa entre as campanhas ($p=0,007$) (Figura 15).

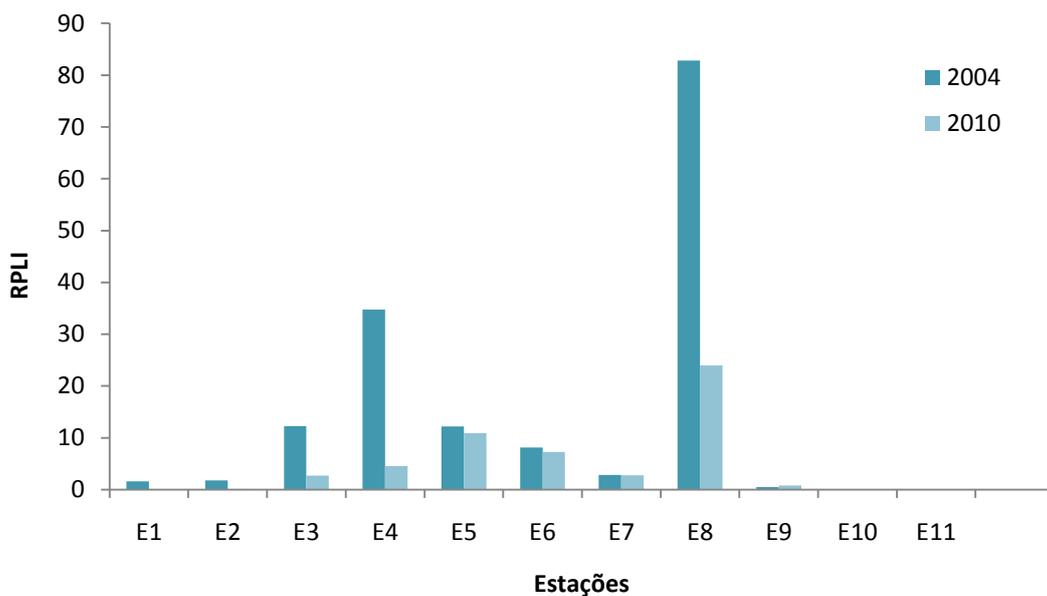


Figura 15. Gráfico comparativo para RPLI em *S. haemastoma* entre as campanhas 2004/2005 e 2010/2011

5 DISCUSSÃO

Em diversas partes do mundo, a contaminação por COEs tem sido associada diretamente a áreas com circulação de barcos e outras atividades marítimas, sendo observadas, nessas áreas, altas concentrações de TBT e seus derivados em amostras de água, sedimentos e biota. (TAKAHASHI *et al.* 1999a; STRAND e ASMUND, 2003; BHOSLE *et al.* 2004; STRAND *et al.* 2009).

Por esse motivo, diversos estudos têm relatado alta incidência de imposex em áreas próximas a terminais portuários, marinas e estaleiros, apresentando, em geral, redução dos níveis à medida que há um distanciamento das fontes principais de organoestânicos (FOLSVIK *et al.* 1999; AXIAK *et al.* 2003; CASTRO *et al.* 2005; CASTRO *et al.* 2007c e 2007d; LIMA-VERDE *et al.* 2010).

No presente estudo, assim como naquele de CASTRO *et al.* (2007c), foi possível observar uma redução gradativa da incidência de imposex em *Stramonita haemastoma* à medida que as estações se distanciavam do porto. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados no Mediterrâneo com a espécie *Hexaplex trunculus* (AXIAK *et al.* 1995), no Japão com *Thais clavigera* (HORIGUCHI *et al.* 1998a), na Irlanda, utilizando-se *Nucella lapillus* e *Littorina littorea* (MINCHIN *et al.* 1996), na Tailândia, com as espécies *Chicoreus capucinus* e *Thais distinguenda* (BECH, 2002), além de diversos outros locais.

A alta incidência de imposex na praia Mansa (E8) é indicativa de grande contaminação na área. Esta estação corresponde à Praia Mansa que é uma formação costeira artificial, resultante da construção do molhe principal de proteção da baía de evolução do Porto do Mucuripe. Do ponto de vista de sua localização, a mesma está dentro da zona operacional portuária sendo de influência direta das atividades do porto, e por este motivo está sujeita a uma maior contaminação por compostos orgânicos de estanho.

SMITH (1996) observou redução seletiva da incidência de imposex em áreas com atividades marítimas, após restrições ao uso de TBT na Nova Zelândia. Segundo o autor, áreas sujeitas apenas à navegação de passeio apresentaram redução significativa em índices como RPSI e % de imposex, enquanto áreas sujeitas à presença de navios comerciais de grande porte apresentaram redução apenas no RPSI, ainda havendo grande incidência da síndrome. Este padrão foi observado no presente estudo, não sendo

observada redução na incidência de imposex na praia Mansa (E8), apesar de uma significativa redução dos demais índices avaliados.

A presença de fêmeas em estágios avançados de imposex na estação da praia Mansa (E8), bem como a ausência de animais jovens na área é um indicativo de que pode estar havendo um declínio populacional na região do porto do Mucuripe.

Na campanha realizada em 2004/2005 (CASTRO *et al.* 2007), além das estações reamostradas no presente estudo, foram coletados animais em uma estação próxima ao terminal portuário e ao mercado de peixes de Fortaleza, onde há grande concentração de pequenos barcos de pesca. Na amostragem de 2010/2011, não foram observados animais nesta área. Esse fato pode ser indicativo de extinção da referida população nesta estação, que já apresentou altos índices de imposex em 2004/2005.

Declínio populacional já foi observado por alguns autores em diversas espécies, como *Nucella lapilus*, *Urosalpinx cinerea*, *Buccinum undatum*, *Ocenebrina aciculata* e *Babylonia japonica* (BRYAN *et al.* 1986; GIBBS *et al.* 1991; tem HALLERS-TJABBES *et al.*, 1996; OEHLMANN *et al.* 1996; HORIGUCHI *et al.* 2006), todos os casos associados à contaminação por organoestânicos.

Apesar da diminuição da incidência nas estações mais afastadas do terminal portuário, foi observado um aumento na porcentagem de imposex em algumas estações, como as estações E6 (Poço da Draga), próxima a uma marina, e E4 (Barra do Ceará), próxima à desembocadura do rio Ceará, onde existem dois pequenos estaleiros para embarcações de pequeno e médio porte. Estas áreas estão fortemente influenciadas por estas fontes de COEs na costa de Fortaleza, acarretando em maiores níveis de imposex nas áreas contíguas a essas fontes.

Segundo TEN HALLERS-TJABBES *et al.* (2003), além da distância em relação à provável fonte dos organoestânicos para o meio ambiente e da intensidade de tráfego marinho, devem ser levados em consideração condições hidrográficas como a profundidade, o hidrodinamismo e o grau de proteção da área em questão. Todos esses fatores contribuem para a dispersão ou acúmulo do TBT em determinadas áreas, proporcionando um menor ou maior efeito da biota local.

A redução da incidência de imposex ocorreu a oeste das principais fontes de organoestânicos, estando de acordo com o sentido Leste-Oeste das correntes costeiras predominantes no litoral do estado do Ceará (MAIA *et al.* 1998).

Com as restrições implementadas, ao longo dos anos, sobre o uso do TBT em tintas antiincrustantes, muitos estudos têm demonstrado uma relativa melhora da

contaminação por esse composto, refletida em uma redução dos níveis de imposex observados e até mesmo o restabelecimento de algumas populações em áreas onde foram anteriormente extintas (EVANS et al. 1991; TESTER e ELLIS, 1995; REITSEMA et al. 2002; GALANTE-OLIVEIRA *et al.* 2009; MORTON, 2009).

Houve redução significativa dos índices FPLI, VDSI e RPLI durante a campanha 2010/2011, com relação aos resultados obtidos em 2004/2005 por CASTRO *et al.* (2007).

Diversos estudos, como os desenvolvidos por ZHENGYAN (2005), com *Thais clavigera*, e por VASCONCELOS *et al.* (2011) com *Bolinus brandaris*, têm demonstrado que o tamanho do pênis dos machos é afetado pela sazonalidade, bem como pelo estágio do ciclo reprodutivo anual. Para esses autores, a aplicação de índices como RPLI e RPSI em comparações temporais ou espaciais, deve ser feita de forma cautelosa, sendo mais significativa quando as coletas são realizadas no mesmo período, evitando que os resultados sejam tendenciosos. Caso este pré-requisito não seja cumprido, o VDSI é um melhor indicador quando se pretende comparar intensidade de imposex.

O período de coletas realizadas por CASTRO *et al.* (2007) durante a campanha 2004/2005 (Outubro a Fevereiro) foi praticamente o mesmo utilizado para as coletas em 2010/2011 (Setembro a Fevereiro). Desta forma, exclui-se a hipótese de os índices terem apresentado redução devido a sazonalidade.

Segundo GALANTE-OLIVEIRA *et al.* (2010), outro fator que pode influenciar comparações acerca dos níveis de imposex é o tamanho das conchas dos animais. Segundo estes autores, o tamanho da concha influencia o tamanho do pênis dos machos, o que poderia afetar os resultados principalmente de RPLI. VASCONCELOS *et al.* (2011) também observaram correlação entre o tamanho da concha e o pênis de machos e fêmeas, no entanto, com coeficientes de correlação maiores para os machos.

Os resultados do presente estudo também demonstram que há relação entre o tamanho da concha e o tamanho do pênis tanto em machos quanto em fêmeas, assim, poder-se-ia esperar que estações com animais maiores na campanha de 2010/2011 apresentassem índices mais elevados que em 2004/2005. No entanto, observou-se diminuição dos índices em todas as estações amostradas, enquanto apenas três estações apresentaram queda significativa no tamanho das conchas, entre as amostragens de 2004/2005 e 2010/2011.

Assim, mesmo com o aumento relativo do tamanho das conchas dos animais em quase todas as estações, houve redução geral dos índices de avaliação do imposex, este chegando, até mesmo, a não ser detectado em estações que apresentavam 100% de fêmeas afetadas em 2004/2005, como é o caso da praia do Pacheco (E1).

Desta forma, a redução desses índices pode estar associada à diminuição da contaminação por compostos orgânicos de estanho na costa de Fortaleza e região metropolitana.

A Convenção Internacional sobre Controle de Sistemas Antiincrustantes Danosos em Navios, de 2001, teve por propósito reduzir ou eliminar os efeitos nocivos ao meio ambiente marinho e à saúde, causados por sistemas antiincrustantes. Nesse sentido, previa diversas datas para a restrição gradativa do uso desses compostos.

No Brasil a Convenção foi aprovada na Câmara dos Deputados e, em 24/02/2010, encaminhada ao Senado Federal (Projeto de Decreto Legislativo 31/2010), visando sua ratificação pelo Governo do Brasil (SENADO FEDERAL, 2011).

Apesar da recente promulgação do Decreto Legislativo pelo Senado Federal Brasileiro, a Convenção foi adotada por muitos países ainda em 2001 e entrou em vigor mundialmente a partir de 2008. Assim, o tráfego de navios internacionais nos portos brasileiros, utilizando substâncias danosas como o TBT em seus revestimentos, tem diminuído ao longo dos anos. Com isso, espera-se que haja uma redução dos níveis de contaminação, não somente em países com histórico de restrições mais antigas, mas em todo o mundo, inclusive no Brasil.

Apesar da tendência global de diminuição da contaminação por COEs a partir das restrições implementadas ao longo dos anos por diversos países, alguns estudos têm demonstrado o aumento dos índices de imposex em algumas partes do mundo. É o caso observado em algumas regiões do Golfo da Tailândia (SWENNEN *et al.* 2009) e na região de Ria de Aveiro, em Portugal (GALANTE-OLIVEIRA *et al.* 2010).

Segundo GALANTE-OLIVEIRA *et al.* (2010), o aumento do imposex na espécie *Hidrobia ulvae* na região de Ria de Aveiro pode estar associado à tendência de evolução temporal de cada espécie, uma vez que o mesmo autor observou queda nos índices, no mesmo período e mesma área, para as espécies *Nassarius reticulatus* e *Nucella lapillus*.

Neste sentido, estudos de imposex envolvendo outras espécies afetadas na região de Fortaleza, como *Stramonita rustica*, *Nassarius vibex* e *Pugilina morio* podem ser

importantes para esclarecer os padrões de evolução da síndrome em resposta à contaminação.

De acordo com SWENNEN et al. (2009), o aumento nos níveis de imposex no Golfo da Tailândia pode estar associado à extensa dragagem realizada no leito do rio Pattani para a construção de um porto maior. Além disso, apontam para a necessidade de regulamentação para o descarte seguro dos sedimentos contaminados e de tintas antiincrustantes após a limpeza dos navios.

O porto do Mucuripe passa atualmente por um processo de dragagem, o que pode gerar a remobilização de TBT presente nos sedimentos, aumentando assim a contaminação da área. Desta forma, é possível que a médio ou longo prazo haja novamente um aumento dos níveis de imposex nas populações sob influência do terminal portuário. Por este motivo, trabalhos de monitoramento são de grande importância para a referida área, visando o acompanhamento das condições ambientais.

6 CONCLUSÕES

- Houve redução geral nos índices de avaliação do imposex na área sob influência do terminal portuário do Mucuripe no período entre 2004/2005 e 2010/2011.
- A redução dos índices é um indicativo de uma diminuição da contaminação por compostos orgânicos de estanho, a partir da implementação de medidas restritivas ao uso desses compostos em tintas antiincrustantes.
- A presença de populações ainda apresentando sinais da síndrome demonstra a persistência do COEs no ambiente, sendo de grande importância o monitoramento dessa contaminação ao longo dos anos.

Capítulo II: Indução do imposex em *Stramonita haemastoma* em condições de laboratório

1 INTRODUÇÃO

Após constatada a ação tóxica do TBT sobre moluscos gastrópodes, diversos experimentos de indução do imposex passaram a ser realizados. Ainda na década de 80, BRYAN *et al.* (1988) testaram a efetividade do cloreto de tributilestano e outros cinco compostos de estanho em induzir o imposex em *Nucella lapillus*. Da década de 90 até o presente, foram realizados estudos com diversas espécies de neogastrópodes, dentre elas várias espécies da família Muricidae como *Nucella lima*, *Thais clavigera*, *Bolinus brandaris*, *Hexaplex trunculus* e *Stramonita haemastoma* (STICKLE *et al.* 1990; Horiguchi *et al.* 1997; Santos *et al.* 2006; Garaventa *et al.* 2006; Lima Verde *et al.* 2007), além de outras como *Buccinum undatum*, da família Buccinidae (Mensink *et al.* 1996; 2002), e *Ilyanassa obsoleta*, da família Nassaridae (McClellan-Green *et al.* 2006).

Experimentos de indução em laboratório foram utilizados em muitos estudos como uma ferramenta na tentativa de elucidar o mecanismo de ação do TBT e outros compostos (Oberdoster *et al.* 1998; Oberdorster e McClellan-Green, 2000; 2002; Gooding *et al.* 2003; Santos *et al.* 2005, Garaventa *et al.* 2008). Além desse propósito, a indução do imposex também é utilizada para caracterizar o desenvolvimento da síndrome em diferentes espécies, já que se observam diferentes padrões de desenvolvimento. Outros objetivos também podem ser alcançados através desse enfoque metodológico, como a diferença de sensibilidade entre espécies (Castro, 2007c) e a resposta a diferentes estressores (Bryan *et al.* 1988). O acúmulo diferencial de TBT e outros contaminantes nos diferentes tecidos também já foram alvo de estudo em experimentos de indução do imposex.

Diversas metodologias de indução têm sido utilizadas com êxito nestes estudos, como a exposição em meio aquoso, com o contaminante dissolvido (Barroso *et al.* 2002), a exposição via dieta contaminada (Lima *et al.* 2006), ou mesmo a inoculação direta do contaminante no corpo do animal (Horiguchi *et al.* 1997; Lima Verde *et al.* 2007). Alguns estudos se utilizam de mais de uma via de exposição, comparando seus efeitos (Stickle *et al.* 1990) ou avaliando os seus efeitos somados, como em

experimentos de transplante, onde animais sadios são expostos a um ambiente contaminado e alimentados com dieta também contaminada (QUEIROZ *et al.* 2007).

Um estudo realizado por BARROSO *et al.* (2002) não apresentou dados de mortalidade causada pela exposição ao TBT em meio aquoso, assim, comparativamente a outras metodologias de indução, a exposição em aquários ocasiona um estresse menor para os animais. No entanto, a exposição através da inoculação de contaminante oferece na maioria dos casos, respostas mais rápidas, sendo de grande valia para testes de toxicidade aguda. A indução do imposex em *Stramonita haemastoma* já foi obtida com apenas 14 dias após inoculação com TBT (LIMAVERDE *et al.* 2007), demonstrando a eficiência desta metodologia. Desta maneira, experimentos de indução podem fornecer variadas respostas, sendo de grande importância para o entendimento da síndrome e para sua utilização como biomarcador de contaminação.

Com base no exposto, levanta-se a hipótese de que o cloreto de tributilestanho é capaz de induzir o imposex em *S. haemastoma*, havendo correlação positiva entre o tempo de exposição ao contaminante e os níveis de imposex desenvolvidos pela espécie.

2 OBJETIVOS

Considerando a discussão, a presente pesquisa tem como objetivos:

- Acompanhar o desenvolvimento do imposex em *Stramonita haemastoma* através da indução em laboratório com cloreto de tributilestanho.
- Comparar os resultados obtidos, com outras metodologias de indução para a mesma espécie.

3 METODOLOGIA

Foram coletados 650 indivíduos de *S. haemastoma* na praia da Caponga, no município de Cascavel, Ceará. Avaliações anteriores constataram ausência de imposex nos indivíduos desta população (LIMA, 2004).

Os animais foram acondicionados em recipientes plásticos com água do mar e levados para o Laboratório de Zoobentos, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) onde permaneceram 15 dias em período de aclimatação, em aquários de 30L (média de 50 animais por aquário) com água do local de coleta e aeração constante. Na metade do período de aclimatação (7º dia) os animais foram alimentados com bivalves *Brachidontes spp.* coletados na praia da Sabiaguaba, uma área livre de imposex e conseqüentemente, da contaminação por organoestênicos (CASTRO, 2007c), para evitar a contaminação através da dieta.

Os animais foram divididos em três grupos: Experimento (EX), Controle Nulo (CN) e Controle com Álcool (CA). Um experimento piloto resultou em grande mortalidade de animais após inoculação com Cloreto de Tributilestanho e por esse motivo, um número maior de animais foi destinado ao grupo EX, que contou com 350 animais, os demais ficando divididos igualmente entre os grupos CN e CA.

Os aquários eram limpos diariamente através da sucção de material do fundo, com o auxílio de uma mangueira, e a água completamente renovada a cada semana, sendo utilizada para a troca, água do mar coletada na praia da Sabiaguaba, em Fortaleza-CE. No período do experimento, os animais eram alimentados quinzenalmente também com bivalves *Brachidontes spp.* coletados na mesma área. Durante a aclimatação dos animais, dados de mortalidade foram anotados para cada grupo, bem como durante todo o período do experimento, a fim de comparar a mortalidade e definir se durante o período do experimento esta foi normal, ou possivelmente causada pelo TBT.

3.1 Bioensaio

Após 15 dias do período de aclimatação, os animais do grupo EX foram narcotizados com solução salina de $MgCl_2$ 3,5% em proporção de 1:1 de água destilada com água do mar (HUET *et al.* 1995) até não oferecerem resistência ao manuseio.

Foram preparadas duas soluções de cloreto de tributilestanho (TBTCl), a serem utilizadas de acordo com o peso corporal total (partes moles + concha) de cada animal. As soluções foram diluídas em álcool etílico absoluto e possuíam concentrações de 5 e 10ug/uL.

Cada animal foi pesado individualmente em balança analítica e posteriormente recebeu uma injeção de solução de TBTCl. O volume de solução aplicado correspondia sempre à uma dose de 1ug de TBT/g de peso corporal total (PCT) de cada animal. Os animais recebiam injeções de no mínimo 1uL e no máximo 2uL de solução, de acordo com seu peso, assim, um animal com 5g de peso corporal total, recebia 1uL de solução, enquanto um animal com 10g, recebia uma injeção de 2uL. Para manter o volume injetado entre 1 e 2uL, para animais com peso superior a 10g a solução de 10ug/uL foi utilizada.

Os animais do grupo CA também foram narcotizados e então inoculados com 1uL de álcool absoluto PA. As injeções foram feitas no pé dos animais, utilizando-se microseringas cromatográficas HAMILTON de 10uL, com graduações de 0,2uL.

Foram feitas reinjeções a cada 15 dias, e análises foram realizadas com 15, 30 e 45 dias após a primeira injeção. Em cada análise, 10 animais de cada grupo foram narcotizados e então sacrificados para possibilitar a determinação sexual e a observação do surgimento de sinais indicativos de imposex.

3.2 Análise dos níveis de imposex

Os animais tiveram suas conchas medidas da ponta da espira até a extremidade do canal sifonal com auxílio de um paquímetro, e então suas conchas foram removidas com auxílio de torno de bancada (morsa). A determinação sexual foi feita através da presença do receptáculo seminal presente unicamente em fêmeas.

Os pênis de machos e fêmeas afetadas pelo imposex foram medidos com paquímetro de precisão de 0,05mm, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Papilas penianas não-mensuráveis foram consideradas como pênis de 0,1mm de comprimento para o cálculo dos índices e análises estatísticas. As fêmeas foram avaliadas para a presença de estruturas como pênis e/ou vaso deferente (Figura 16)

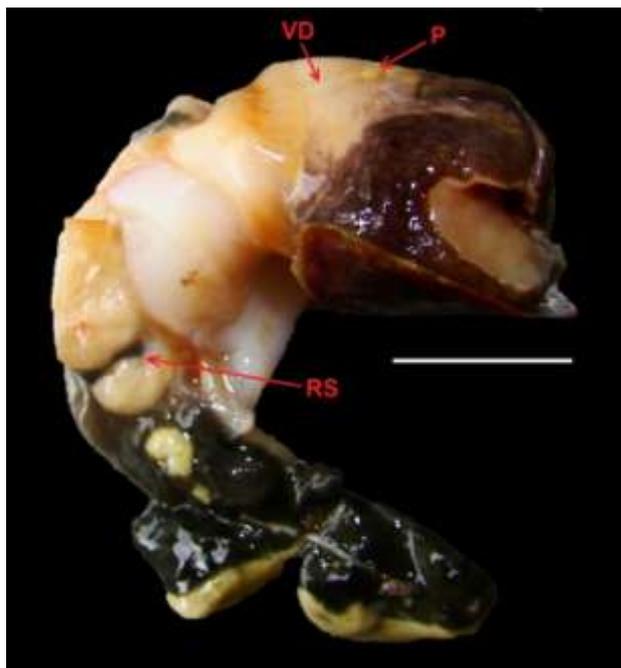


Figura 16. Partes moles de fêmea de *S. haemastoma* com imposex. P: pênis; RS: receptáculo seminal; VD: vaso deferente. (Foto: Deyse Azevedo)

Os índices utilizados foram o FPLI (*female penis length index*), que corresponde ao comprimento médio dos pênis das fêmeas afetadas, RPLI (*relative penis length index*) calculado segundo Tan (1997), e o estágio de VDSI (*vas deferens sequence index*), seguindo a escala proposta por Gibbs (1987) e modificada por Fernandez (2002) para a espécie *S. haemastoma*.

3.3 Análises estatísticas

Para verificar as diferenças de mortalidade nos três grupos durante o período de aclimação dos animais, e durante o experimento, foram realizados testes ANOVA, a um nível de significância de 5%. Para a correlação entre o tempo de experimento e os índices de quantificação observados foi utilizada a correlação de Pearson.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa Excel 2007.

4 RESULTADOS

4.1 Mortalidade

A mortalidade durante o período de aclimação (15 dias anteriores ao início do experimento) foi baixa para os três grupos (Figura 17), não atingindo 5% no grupo CN e chegando a apenas 3,14% no grupo EX e 4% no grupo CA. Não houve diferença significativa entre as mortalidades observadas nos três grupos durante a aclimação ($p=0,56$). Durante todo o período do experimento, o número de mortes no grupo CN também foi baixo, contrastando com as mortes nos grupos EX e CA nos períodos posteriores às injeções (Figura 18). Houve diferença significativa entre o número de mortes observadas nos três grupos ($p=0,009$).

O grupos EX e CA apresentaram picos de mortalidade imediatamente após as inoculações, no entanto, o grupo EX apresentou mortalidade mais acentuada que o grupo CA no mesmo período ($p=0,04$). As maiores mortalidades observadas no grupo EX aconteceram no 2º ou 3º dia após as injeções, demonstrando a rápida ação tóxica do TBT no organismo, causando a morte.

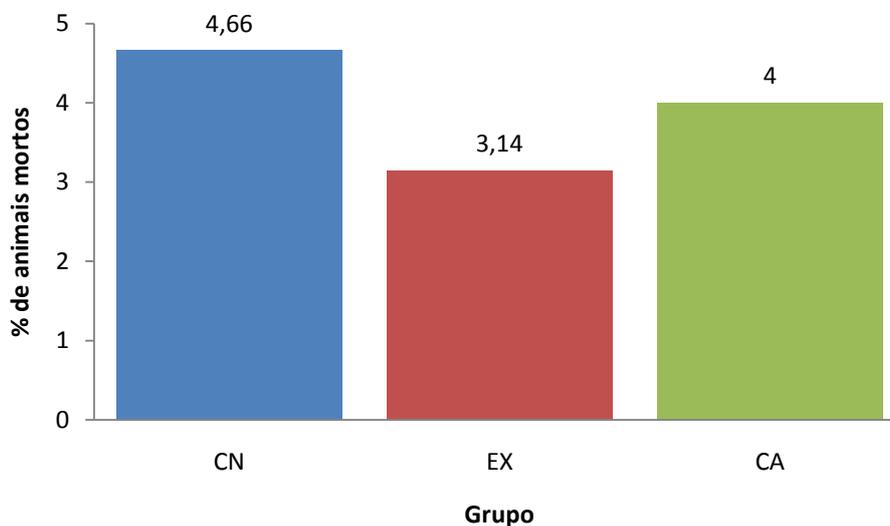


Figura 17. Percentual de exemplares de *S. haemastoma* mortos durante o período de aclimação (15 dias anteriores ao início do experimento). CN: controle nulo; EX: experimento; CA: controle com álcool.

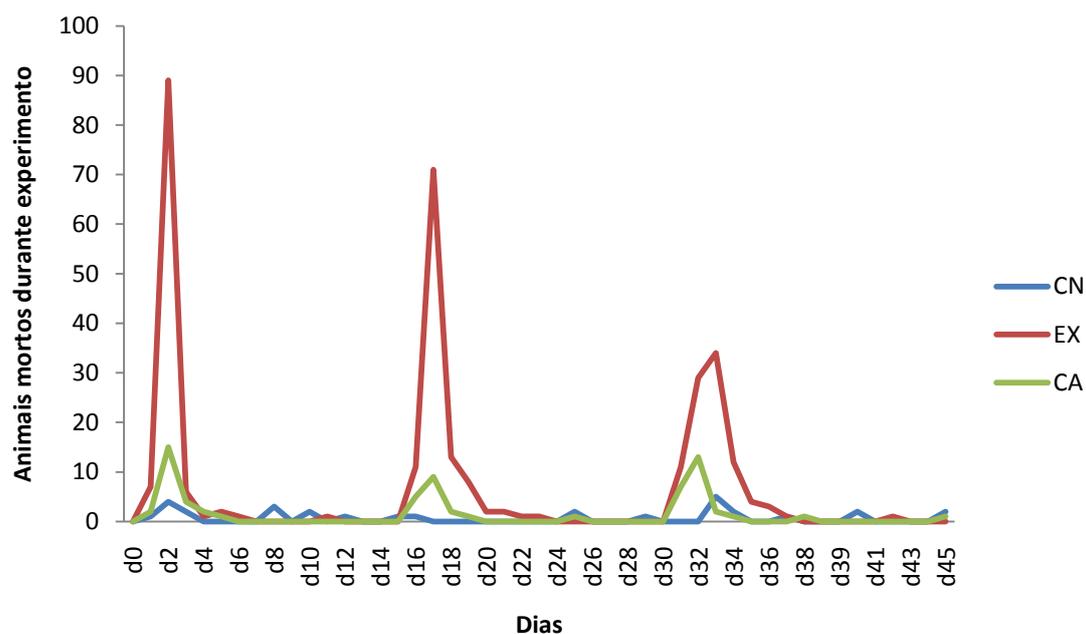


Figura 18. Número de indivíduos de *S. haemastoma* mortos durante o experimento de indução do imposex. CN: controle nulo; EX: experimento; CA: controle com álcool

4.2 Quantificação do imposex

A ocorrência de sinais indicativos de imposex não foi observada na primeira amostragem (15 dias), atingindo 33,3% das fêmeas com 30 dias após a primeira inoculação e chegando a 75% das fêmeas apresentando algum sinal de imposex com 45 dias (Tabela 6, Figura 19). A porcentagem de fêmeas com imposex mostrou forte correlação com o tempo do experimento ($r=0,93$).

Tabela 6. Resultados do experimento de indução do imposex em *S. haemastoma*

Análise	N amostral	Machos/ Fêmeas	% imposex	FPLI	RPLI	VDSI (média)
15 dias	10	5 / 5	0	0	0	0 (0)
30 dias	10	4 / 6	33,3	0,1	2,39	0 - I - II (0,5)
45 dias	10	6 / 4	75	0,46	13,86	0 - I - II (1,25)



Figura 19. Percentual de fêmeas de *S. haemastoma* com imposex, observadas durante o experimento de indução.

Os índices de quantificação foram crescentes durante as três amostragens, apresentando forte correlação com o tempo (FPLI: $r=0,87$; RPLI: $r=0,85$). Ambos os índices (FPLI e RPLI) foram iguais a zero com 15 dias. O FPLI aos 30 dias foi igual a 0,1, chegando a 0,46 com 45 dias (Figura 20). O RLPI calculado para 30 dias foi igual a 2,39 e atingiu 13,86 aos 45 dias (Figura 21).

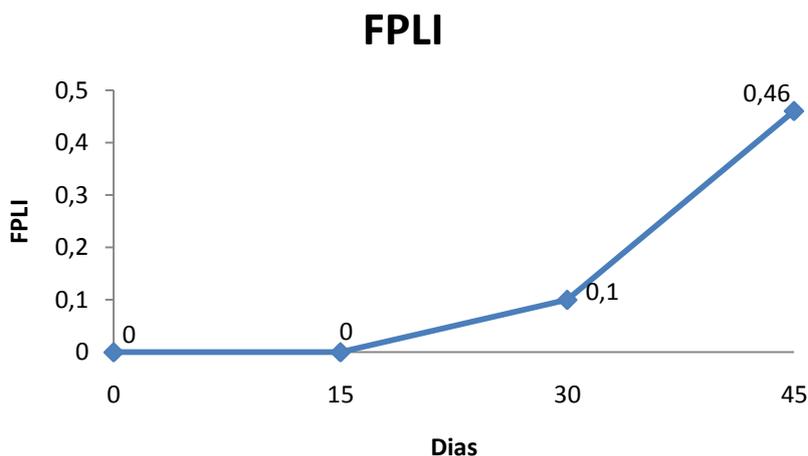


Figura 20. FPLI (*female penis length index*) de *S. haemastoma* observado durante o experimento de indução.

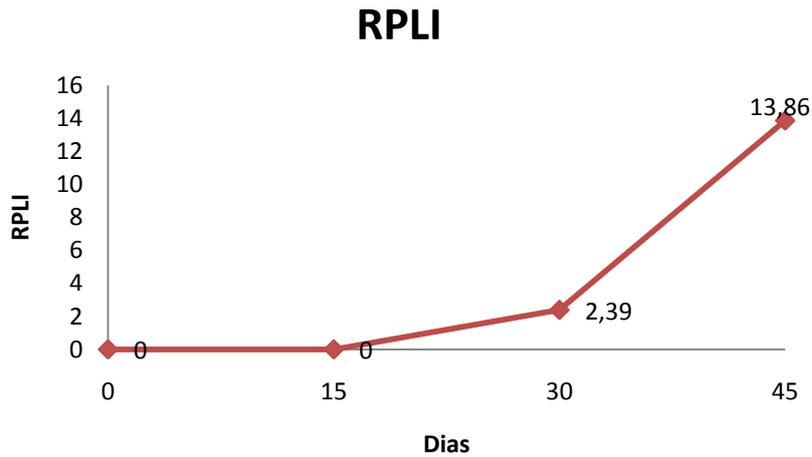


Figura 21. RPLI (*relative penis length index*) de *S. haemastoma* observado durante o experimento de indução.

O VDSI, que caracteriza o estágio de desenvolvimento do imposex individualmente, permaneceu igual a 0 aos 15 dias, com todas as fêmeas sem nenhum sinal de desenvolvimento da síndrome. Com 30 dias, foram observadas duas fêmeas afetadas pelo imposex (33,3%), cada uma delas apresentando um estágio diferente de VDSI: O estágio I, caracterizado pela presença de uma papila, e o estágio II, com a presença de um pênis menor que 2mm de comprimento. Aos 45 dias, o estágio II foi mais prevalente entre as fêmeas com imposex (66,6% das fêmeas afetadas, e 50% de todas as fêmeas), sendo possível a observação do início de formação do vaso deferente (Figura 22).

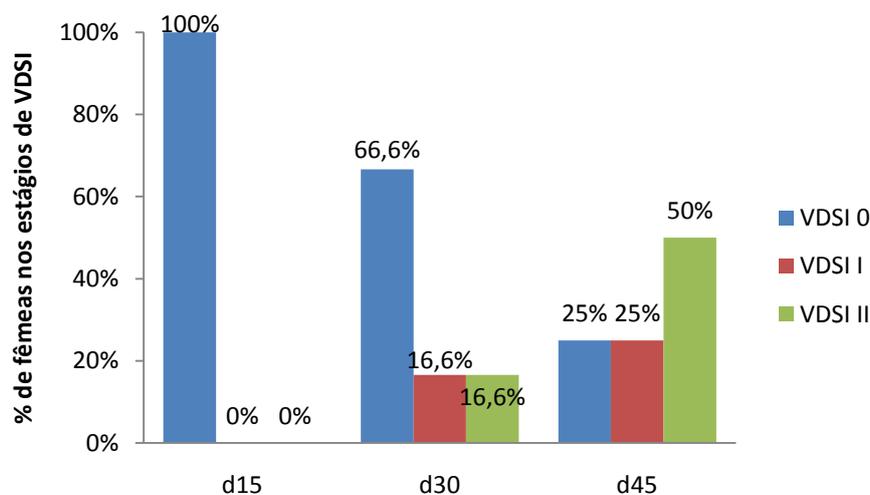


Figura 22. Percentual de fêmeas de *S. haemastoma* nos diferentes estágios de VDSI (*vas deferens sequence index*) observado durante o experimento de indução.

5 DISCUSSÃO

A mortalidade observada no grupo controle nulo (CN) foi baixa durante todo o período do experimento, não apresentando picos e por isso foi considerada como normal, visto a manutenção de animais em laboratório, em condições diferenciadas de seu hábitat ser um fator estressante.

A mortalidade observada no grupo controle alcoólico (CA) apresentou pequenos picos nos períodos seguintes às inoculações, provavelmente devido ao estresse causado pela introdução da agulha no músculo dos animais e não ao álcool injetado. Segundo OBERDOSTER & MCCLELLAN-GREEN (2000), um volume de até 5uL de etanol pode ser injetado a cada 2 dias sem dano ao animal. As injeções eram feitas no músculo do pé dos animais, o que pode causar um estresse maior que injeções feitas mais superficialmente, no subcutâneo, como as realizadas por OBERDORSTER e MCCLELLAN-GREEN (2002) com a espécie *Ilyanassa obsoleta*, ocasionando as mortes.

Já o grupo experimento (EX) apresentou uma mortalidade bastante acentuada nos mesmos períodos seguintes às inoculações, possivelmente ocasionada pelo efeito aditivo do estresse causado pela injeção e do efeito tóxico do cloreto de tributilestanho.

Estudos realizados por LIMAVERDE *et al.* (2007) com a espécie *S. haemastoma*, bem como o experimento realizado por OBERDORSTER e MCCLELLAN-GREEN (2002) com *Ilyanassa obsoleta*, utilizaram doses da ordem de ng de TBT/g de tecido fresco e apresentaram baixa mortalidade de animais durante o experimento. A dose utilizada no presente estudo foi de 1ug TBT/g do peso corporal total, o que representa uma ordem de grandeza maior que estudos anteriores, o que pode justificar o maior efeito tóxico do TBT causando a mortalidade de muitos animais após as injeções. HORIGUCHI *et al.* (1997) utilizaram doses de 10ug de organoestênicos/g de animal em um experimento de indução do imposex com a espécie *Thais clavigera* e também relataram muitas mortes de animais com 1 ou 2 dias após as injeções, assim como no presente estudo, em que o maior número de mortes ocorreu entre o 2º e 3º dias após cada inoculação.

A grande mortalidade de animais nos primeiros dias após as injeções pode ser atribuída à toxicidade aguda do TBT no organismo.

A porcentagem de imposex foi crescente durante o período do experimento, apresentando forte correlação com tempo de exposição. No entanto, o número de

fêmeas afetadas pela síndrome neste experimento foi consideravelmente menor do que o obtido em outros estudos de indução utilizando *S. haemastoma*. LIMAVERDE *et al.* (2007), por exemplo, obtiveram 50% de fêmeas com algum sinal de imposex, em apenas 14 dias de experimento, porém com um menor tempo de exposição e menor dose.

UDELSMANN (2009) realizou um estudo genético com populações de *S. haemastoma* nos litorais de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro e demonstrou que aquelas populações podem ser divididas em dois grupos geneticamente distintos, que no entanto, não apresentam diferenças morfológicas. Segundo UDELSMANN (2009) os grupos possuem características genéticas típicas de espécies distintas cogenéricas, no entanto, considera mais cauteloso tratar *S. haemastoma* como um complexo de espécies. As diferenças genéticas existentes entre essas populações, que teoricamente possuem uma continuidade em sua distribuição, podem estar presentes também se considerarmos populações ainda mais distanciadas, como populações de litoral fluminense e do litoral cearense. Assim, é possível que estas diferenças de sensibilidade para *S. haemastoma* no experimento de LIMAVERDE *et al.* (2007) e no presente estudo sejam ocasionadas por características distintas dos animais das diferentes populações em que foram coletados. Para comprovar tal hipótese, um estudo genético envolvendo as citadas populações seria bastante elucidativo.

Outra hipótese para as diferenças encontradas nos dois estudos seria a diferença de suscetibilidade ocasionada pela sazonalidade. Segundo STERNBERG *et al.* (2008b), a sinalização mediada pelo RXR (receptor de retinóide X), pode ser um importante regulador da recrudescência sexo-específica - uma sinalização prematura via RXR estimula a recrudescência masculina, enquanto uma sinalização tardia estimula a recrudescência feminina. Assim, o TBT atuaria como um agonista do RXR e seria capaz de induzir o imposex em fêmeas, iniciando prematuramente a sinalização durante a janela temporal da recrudescência masculina normal (STERNBERG *et al.* 2010). Esta suposição é reforçada pela observação feita por GOODING (2002) de que o foi capaz de estimular o desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos em fêmeas somente quando a exposição ocorreu durante a janela temporal de recrudescimento do sexo masculino.

A eficiência do TBT em induzir o imposex pode então, estar relacionada ao período em que os animais são expostos ao contaminante. Diversos fatores influenciam a reprodução em moluscos, no entanto, a temperatura e o fotoperíodo têm papel chave

na sazonalidade do desenvolvimento do trato reprodutivo (STERNBERG *et al.* 2010). Assim, as diferenças de temperatura em diferentes regiões podem influenciar o período de recrudescência entre populações de uma mesma espécie. O presente estudo foi realizado durante os meses de agosto e setembro (primavera), enquanto o experimento realizado por LIMAVERDE *et al.* (2007) ocorreu durante o verão (janeiro), assim, é possível que a realização deste experimento não tenha ocorrido durante a janela temporal do desenvolvimento sexual masculino normal, explicando a menor incidência de imposex neste estudo.

LIMA *et al.* (2006) em um experimento de indução através da dieta contaminada por organoestênicos obtiveram resultados mais rápidos na indução do imposex em *S. haemastoma*, bem como QUEIROZ *et al.* (2007) para a mesma espécie, em um experimento de transplante de animais saudáveis para áreas contaminadas e alimentados com ostras também contaminadas. Ambos os estudos obtiveram 100% de fêmeas com imposex passados 15 dias do início do experimento, contrastando com os resultados obtidos na indução via injeção, que atingiram 75% somente com 45 dias.

A menor incidência de imposex via injeção pode ser ocasionada também pela rota de entrada/absorção do TBT, uma vez que o padrão de acúmulo nos tecidos depende da via de absorção. O TBT é um composto lipofílico, então se acumula preferencialmente em tecidos com alto conteúdo de lipídeos, como reprodutivos e digestivos, em detrimento dos demais tecidos, principalmente músculos. Experimento realizado com *Thais clavigera* constatou que o TBT se acumula inicialmente, tanto via exposição aquosa, quanto via exposição pela dieta, principalmente nos órgãos reprodutivos (46-47%) e trato digestivo (38-42%), enquanto apenas cerca de 15% do total de TBT ficam confinados nos demais tecidos (WANG *et al.* 2010).

Nos gastrópodes, a absorção de TBT dissolvido ocorre primariamente via tecidos associados ao manto, enquanto animais submetidos à dieta contaminada absorvem eficientemente o TBT via glândula digestiva que então tem papel importante na sua degradação (BRYAN *et al.* 1993. WANG *et al.* 2010). Gastrópodes biotransformam o TBT utilizando reações de debutilação mediadas por enzimas do citocromo p450 (FENT, 1996), no entanto as reações de detoxificação/eliminação mediadas por este citocromo parecem restritas (GOODING e LEBLANC, 2001), o que pode resultar em uma transformação limitada do TBT e conseqüentemente, seu acúmulo (BRYAN *et al.* 1993).

Segundo WANG *et al.* (2010), os tecidos digestivos são a área predominante de degradação do TBT, enquanto os demais tecidos, têm um menor potencial para o metabolismo. O TBT é absorvido pelo tecido digestivo, e somente depois redistribuído para outros tecidos pela circulação sanguínea, assim, os demais tecidos como a musculatura são o último compartimento para acumulação de TBT (COELHO *et al.* 2002). Este fato poderia explicar a baixa incidência de imposex em animais expostos ao TBT via intramuscular, uma vez que o músculo é o último destino do TBT, enquanto o alvo principal para o desenvolvimento do imposex são os tecidos reprodutivos.

Os índices de quantificação do imposex foram crescentes durante as amostragens, evidenciando a relação tempo de exposição versus imposex, demonstradas por diversos outros estudos (LIMA *et al.* 2006; LIMAVERDE *et al.* 2007; QUEIROZ *et al.* 2007).

O RPLI observado em *S. haemastoma* neste experimento foi menor que o encontrado por LIMAVERDE *et al.* (2007) e QUEIROZ *et al.* (2007) para a mesma espécie. Como o valor do FPLI é utilizado para o cálculo do RPLI, pode-se inferir que os valores de FPLI aqui encontrados também foram menores que os obtidos em estudos anteriores. No entanto, a metodologia utilizada por LIMAVERDE *et al.* (2007) considerou apenas fêmeas com pênis mensuráveis a partir de 1mm de comprimento, enquanto QUEIROZ *et al.* (2007) considerou fêmeas apenas com papilas como afálicas, utilizando-se para fins de cálculo, a média dos pênis das fêmeas, como o comprimento do pênis para as fêmeas afálicas. No presente estudo, todas as fêmeas com sinais de imposex foram utilizadas nos cálculos de FPLI e RPLI, considerando-se aquelas com papilas com impossibilidade de serem medidas, como possuindo pênis de 0,1mm, o que possivelmente reduziu o valor dos índices neste estudo.

Os estágios de VDSI foram similares aos demais estudos experimentais realizados com a mesma espécie, atingindo apenas o grau II tanto pela escala proposta por FERNANDEZ *et al.* (2002) para *S. haemastoma*, quanto pela escala proposta por QUEIROZ *et al.* (2007) que conta com rotas alternativas de desenvolvimento do imposex.

QUEIROZ *et al.* (2007) encontrou percentuais elevados (até 46,2%) de afalia em fêmeas utilizadas em experimento de transplante, e atribuiu este fenômeno a uma possível presença do alelo responsável pela síndrome de Dumpton na população da praia da Caponga, de onde estes organismos eram provenientes. A síndrome é uma característica genética que leva a um defeito no desenvolvimento dos órgãos sexuais de

gastrópodes. Nos machos, pode ocasionar subdesenvolvimento do pênis e/ou vaso deferente até completa ausência de pênis, enquanto nas fêmeas, a síndrome de Dumpton favorece a sobrevivência em populações expostas à contaminação por TBT, uma vez que o desenvolvimento do pênis e outras características masculinas nestas fêmeas é afetado, dificultando o desenvolvimento do imposex (GIBBS, 1993).

A Síndrome de Dumpton (SD) foi observada inicialmente em populações de *Nucella lapillus*, também da família Muricidae, no sudeste da Inglaterra (GIBBS, 1993) e, segundo GIBBS (2005), até algumas décadas se mantinha em baixos níveis nas populações da costa inglesa, no entanto, a frequência desta mutação tem crescido até níveis detectáveis, afetando ambos os sexos.

No presente estudo, não foram observados machos afálicos, no entanto, 40% das fêmeas com sinais de imposex apresentaram apenas o desenvolvimento de papilas, consideradas no estudo de QUEIROZ *et al.* (2007) como fêmeas afálicas. Vários estudos têm demonstrado a baixa frequência de machos afálicos em comparação às fêmeas imposexadas em populações com SD (SANTOS *et al.* 2002; QUINTELA *et al.* 2002). QUINTELA *et al.* (2002), propõem que o calibre do vaso deferente é mais indicado para avaliar a presença da síndrome. Desta forma, a ausência de machos afálicos no presente estudo não descarta a possibilidade de a população utilizada no experimento possua o alelo para SD.

Assim, é possível que a população de *S. haemastoma* da praia da Caponga, utilizada também neste estudo, possua o alelo responsável pela síndrome de Dumpton, ocasionando uma redução nos índices de imposex, comparados com outros estudos.

Estudos genéticos que comprovem a presença do alelo para SD nessa população são necessários, uma vez que a visualização do vaso deferente em *S. haemastoma* pode muitas vezes ser bastante complicada.

Ainda não está claro o que causa a diferença de suscetibilidade à ação do TBT entre as espécies, no entanto, a constatação da diferença de resposta entre populações de uma mesma espécie pode ser indicativa da ação diferencial do contaminante durante os estágios de maturação sexual, bem como das características populacionais em função das diferentes regiões.

6 CONCLUSÕES

- O TBT é capaz de induzir o imposex em *S. haemastoma* em condições de laboratório, demonstrando que esta é uma espécie útil em programas de monitoramento de áreas contaminadas.
- A grande mortalidade causada pelas injeções com cloreto de tributilestanho demonstra a toxicidade aguda desse composto para os organismos testados

REFERÊNCIAS

ALZIEU, C.; HERAL, M.; THIBAUD, Y.; DARDIGNAC, M. & FEUILLET, M. (1982) Influence des peintures antisalissures a base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huitre *Crassostrea gigas*. **Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes**, 45(2): 101–116.

ALZIEU, C. (1991). Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. **Marine Environmental Research**, 32: 7-17.

AIRAKSINEN, R.; RANTAKOKKO, P.; TURUNEN, A.W.; VARTIAINEN, T.; VOURINEN, P.J.; LAPPALAINEN, A.; VIHERVUORI, A.; MANNIO, J. & HALLIKAINEN, A. (2010) Organotin intake through fish consumption in Finland. **Environmental Research**, 544-547.

AXIAK, V.; VELLA, A. J.; MICALLEF, D.; CHIRCOP, P. & MINTOFF, B. (1995) Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. **Marine Biology**. 121: 685 – 691.

AXIAK, V.; MICALLEF, D.; MUSCAT, J.; VELLA, A. & MINTOFF, B. (2003) Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. **Environment International**, 28: 743– 749.

AZEVEDO, D.B. (2008) Caracterização do imposex em *Pugilina morio* (Gastropoda: Melongenidae) no estuário do rio Ceará, Fortaleza-CE, por método não sacrificional. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Ceará. 53pp.

BARREIRO, R.; GONZÁLEZ, R.; QUINTELA, M. & RUIZ, J.M. (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. **Marine Ecology Progress Series**, 218: 203–212.

BARROSO, C.M.; REIS-HENRIQUES, M.A.; FERREIRA, M.S.; MOREIRA, M.H. The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 82, p. 249-255. 2002.

BECH, M. (2002) Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. **Environmental Pollution**, 117: 421 – 429.

BHOSLE, N.B.; GARG, A.; JADHAV, S. HARJEE, R.; SAWANT, S.S.; VENKAT, K. & ANIL, A.C. (2004) Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. **Chemosphere**, 57: 897–907.

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

BRAGA, A.R.C.; CASTRO, Í.B.; ROCHA-BARREIRA, C.A. (2006) Compostos organoestânicos: Um risco potencial para contaminação do pescado marinho. **Boletim técnico-científico do CEPENE**, Tamandaré. 14(2): 103-197.

BRYAN, G.M.; GIBBS, P.E.; HUMERSTONE, L.G. & BURT, G.R. (1986) The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around Southwest England: Evidence for tributyltin from antifouling paints. **Journal of the Marine Biological Association U.K.**, 66: 611-640.

BRYAN, G.M.; GIBBS, P.E.; BURT, G.R. & HUMERSTONE, L.G. (1987a) The affects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: Long-term field and laboratory experiments. **Journal of the Marine Biological Association U.K.**, 67: 525–544.

BRYAN, G.M.; GIBBS, P.E. & BURT, G.R. (1988) A Comparison of the Effectiveness of Tri-N-Butyltin Chloride and Five other Organotin Compounds in Promoting the Development of Imposex in the Dog-Whelk, *Nucella Lapillus*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 68: 733-744.

BRYAN, G.M.; BRIGHT, D.A.; HUMMERSTONE, L.G. & BURT, G.R. (1993) Uptake tissue distribution and metabolism of ¹⁴C-labelled tributyltin (TBT) in the dog-whelk *Nucella lapillus*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 73: 889-912.

BUTTLER P.A. (1985) Synoptic review of the literature on the southern oyster drill *Thais haemastoma floridana*. **NOAA Technical Report NMFS**, 35: 1-9.

CAETANO, C.H.S. & ABSALÃO, R.S. (2003) Imposex in *Olivancillaria vesica vesica* (Gmelin) (Gastropoda, Olividae) from a Southeastern Brazilian sandy beach. **Revista Brasileira de Zoologia**, 19(2): 215–218.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, E. (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in

coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, 247: 295-311.

CAMILLO, E., QUADROS, J., CASTRO, Í. B., FERNANDEZ, M. A. (2004) Imposex in *Thais (Stramonita) rustica* (Mollusca: Neogastropoda) (Lamarck, 1822) as an indicator of organotin compounds pollution at Maceió coast (Northeastern Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**. São Paulo, 52(2).

CAO, D.; JIANG, G.; ZHOU, Q. & YANG, R. (2009) Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk. **Journal of Environmental Management**, 90: S16–S24.

CARDOSO, R.S.; CAETANO, C.H.S. & CABRINI, T.M.B (2009) Biphallia in imposexed females of marine gastropods: new record for *Nassarius vibex* from Brazil, **Brazilian Journal of Biology**, 69: 223-224.

CASTRO, I.B.; CASCON, H.M.; FERNANDEZ, M.A (2000). Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca:Gastropoda), uma Indicação da Contaminação por Organoestânicos na Costa do Município de Fortaleza - Ceará - Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, 33: 51-56.

CASTRO, Í.B.; MEIRELLES, C.A.; MATTHEWS-CASCON, H.; FERNANDEZ, M.A. (2004) *Thais (Stramonita) rustica* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Thaididae), a potential bioindicator of contamination by organotin Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 52(2): 51–55.

CASTRO, Í.B.; MEIRELLES, C.A.O.; PINHEIRO, J.C.L.; MATTHEWS-CASCON, H. & ROCHA-BARREIRA, C. A. (2005) The increasing incidence of imposex in *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) after the establishment of the Pecém Harbor, Ceará State, Northeast Brazil. **Thalassas**, 21(2): 71-75.

CASTRO, I.B.; QUEIROZ, L.R.; ROCHA-BARREIRA, C.A. (2007a) Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha – uma revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, 40 (1): 96–112.

CASTRO, I.B.; RIBEIRO-FERREIRA, V.; LIMA, A.F.A.; MEIRELLES, C.A.O. & ROCHA-BARREIRA, C.A. (2007b) Imposex in three prosobranch species from Ilha do Japônês, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. **Thalassas**, 23: 37-42.

CASTRO, Í.B.; ALVES DE LIMA, A.F.; BRAGA, A.R.C. & ROCHA-BARREIRA, C.A. (2007c) Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the

Northeastern Brazilian Coast. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, 2(1): 1-11.

CASTRO, I.B.; BEMVENUTI, C.E. & FILLMANN, G. (2007d) Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, 2(1): 73-79.

CASTRO, I.B.; MEIRELLES, C.A.O.; MATTHEWS-CASCON, H.; ROCHA-BARREIRA, C.A.; PENCHASZADEH, P. & BIGATTI, G. (2008) Imposex in Endemic Volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda), **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51: 1065-1069.

CEARÁ PORTOS, disponível em < <http://www.cearaportos.ce.gov.br/informativo.asp>>, acesso em 06 de janeiro de 2011

CHAMP, M.A. (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **The Science of The total Environment**, 258: 21 – 71.

CHOI, M.; CHOI, H.G.; MOON, H.B.; KIM, G.Y. (2009) Spatial and temporal distribution of tributyltin (TBT) in seawater, sediments and bivalves from coastal areas of Korea during 2001–2005. **Environmental Monitoring and Assessment**, 151: 301–310.

CIA DOCAS DO CEARÁ, Disponível em:<<http://www.docasdoceara.com.br/relato.asp>> acesso em: 07 de janeiro de 2011.

CLAREMONT, M.; WILLIAMS, S.T.; BARRACLOUGH, T.G. & REID, D.G. (2001) The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. **Journal of Biogeography**, 38: 1016–1032.

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

COELHO, M.R.; BEBIANNO, M.J. & LANGSTON, W.J. (2002) Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus* . II. Food as vector of TBT uptake. **Marine Environmental Research**, 54: 193 – 207.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução 357 de 2005. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> acessado em 26 de abril de 2008.

COSTA, M.B.; FERNANDEZ, M.A.; D.C.BARBIERO, D.C.; MELO, F.T.V.; OTEGUI, M.B.P. & FERREIRA, B.S. (2008) First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. 56: 145-148.

CURTIS, L.A. (1994) A Decade Long Perspective on a Bioindicator of Pollution: Imposex on *Ilyanassa obsoleta* on Cape Henlopen, Delaware Bay. **Marine Environmental Research**, 38: 291-302.

DEMAINTENON, M.J. (2000) Ontogeny of the pseudohermaphroditic reproductive system in *Nassarius vibex* (Gastropoda: Buccinidae: Nassariinae). **Journal of Molluscan Studies**, 67: 51-57.

DEPLEDGE, M.H. & BILLINGHURST, Z. (1999) Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. **Marine Pollution Bulletin**, 39(1-12): 32 – 38.

DOKKUM, H.P.; HUWER, S.L. (2005) Tiered environmental risk assessment of methyltins from heat stabilizers in rigid PVC in Sweden. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 41: 73–81.

EFSA - European Food Safety Authority. (2004) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs. **The EFSA Journal**. 102: 1-119.

EGUCHI, S.; HARINO, H.; YAMAMOTO, Y. (2010) Assessment of Antifouling Biocides Contaminations in Maizuru Bay, Japan. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 58:684–693.

ELLIS, D.V. & PATTISINA, L.A. (1990) Widespread Neogastropod imposex: A biological Indicator of global TBT contamination? **Marine Pollution Bulletin**. 24(5): 248 – 253 .

EVANS, S.M.; HUTTON, A. KENDALL, M.A. & SAMOSIR, A.M. (1991) Recovery in populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) suffering from imposex. **Marine Pollution Bulletin**, 22(7): 331-333.

EVANS, S.M.; LEKSONO, T & MCKINNELL, P.D. (1995a) - Tributyltin Pollution: A Diminishing Problem Following Legislation Limiting the Use of TBT-Based Anti-fouling Paints. **Marine Pollution Bulletin**, 30(1):14-21.

EVANS, S.M.; DAWSON, M.; DAY, J.; FRID, C.L.J.; GILL, M.C.; PATTISINA, L. A. & PORTER, J. (1995b) Domestic waste and TBT pollution in coastal areas of Ambom Island. **Marine Pollution Bulletin**. 30(2): 109 – 115.

EVANS, S.M.; EVANS, P.M. & LEKSONO, T. (1996) Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from Tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. **Marine Pollution Bulletin**, 32(3): 263 – 269.

FENT, K. (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, 26:1–117.

FERNANDEZ. M.A.; LIMAVERDE, A.; CASTRO, I.B.; TERRA, A.C. & WARGENER, A.L.R. (2002) 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**. 18(2): 463-476.

FERNANDEZ, M.A.; LIMAVERDE, A.M.; SCOFIELD, A.L. & WAGENER, A.L.R (2005a) Preliminary evaluation of human health risks from ingestion of organotin contaminated seafood in Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 53(1/2): 75-77.

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

FERNANDEZ, M.A.; PINHEIRO, F.M.; QUADROS, J.P. & CAMILLO, E. (2007) An easy, non-destructive, probabilistic method to evaluate the imposex response of gastropod populations. **Marine Environmental Research**, 63: 41-54.

FIORONI, S.P.; OEHLMANN, J. & STROBEN, E. (1991) The pseudohermaphroditism of prosobranchs: morphological aspects. **Zoologischer Anzeiger**, 226:1–26.

FOALE, S. (1993). An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Phillip Bay, Victoria. **Marine Pollution Bulletin**, 26: 546-552.

FOLSVIK, N.; BERGE, J.A.; BREVIK, E.M. & WALDAY, M. (1999) Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway. **Chemosphere**, 38(3) : 681-691.

GALANTE-OLIVEIRA, S.; OLIVEIRA, I.; JONKERS, N.; LANGSTON, W.J.; PACHECO, M. & BARROSO, C.M. (2009) Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: evaluation of legislation effectiveness. **Journal of Environment Monitoring**, 11: 1405–1411.

GALANTE-OLIVEIRA, S. OLIVEIRA, I.; PACHECO, M. & BARROSO, C.M. (2010) *Hydrobia ulvae* imposex levels at Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1998 and 2007: a counter-current bioindicator? **Journal of Environment Monitoring**, 12: 500–507.

GARAVENTA, F; FAIMALI, M.; TERLIZZI, A.; FIORONI, S. & GALLO, G. (2006) Imposex induction in *Hexaplex trunculus* by tributyltin and other stressors. **Marine Environmental Research**, 62(S): S230-S234.

GARAVENTA, F.; CENTANNI, E.; FIORONI, S.; NOVENTA, S.; TERLIZZI, A.; FAIMALI, M. & PAVONI, B. (2008) New implications in the use of imposex as a suitable tool for tributyltin contamination: experimental induction in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) with different stressors. **Cell Biology and Toxicology**, 24:563–571.

GIBBS, P.E. & BRYAN, G.M. (1986) Reproductive failure in populations of the dogwhelk *Nucella lapillus*, ceased by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. **Journal of the Marine Biological Association U.K.** 66: 767 – 777.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P.L. & BURT, G. R. (1987) The use of dogwhelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. **Journal of the Marine Biological Association. U.K.** 67: 507 – 523.

GIBBS, P.E. & BRYAN, G. W. (1987) TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). **Marine Biological Association of the U.K.** 68: 1482 – 1487.

GIBBS, P.E. SPENCER, B.E. & PASCOE, P.L. (1991) The American Oyster Drill, *Urosalpinx cinerea* (Gastropoda): Evidence of decline in an imposex affected population (R. Blackwater, Essex). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 71:827:838.

GIBBS, P.E. (1993) A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favouring the survival of a population in a TBT-polluted area. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 73: 667-678.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. (1994) Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod molluscs. **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**. c. 9, p. 205-226.

GIBBS, P.E. (2005) Male genital defect (Dumpton Syndrome) in the dog-whelk *Nucella lapillus* (Neogastropoda): Mendelian inheritance inferred, based on laboratory breeding experiments. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 85: 143-150.

GODOI, A.F.L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. (2003) Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, 26(5): 708-716.

GOODING, M.; GALLARDO, C. & LEBLANC, G. (1999) Imposex in three marine Gastropod species in Chile and potential impact on Muriciculture. **Marine Pollution Bulletin**. 38(12): 1227 – 1231.

GOODING, M.P. & LEBLANC, G.A. (2001) Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). **General and Comparative Endocrinology**, 122:172–180.

GOODING, M.P. (2002) The role of steroid metabolism in tributyltininduced imposex in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). Doctoral dissertation, Department of Environmental and Molecular Toxicology, North Carolina State University, Raleigh, 214pp.

GOODING, M.P.; WILSON, V.S.; FOLMAR, L.C.; MARCOVICH, D.T.; LEBLANC, G.A. (2003) The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). **Environmental Health Perspectives**. 111(4): 426-430.

GRAY, J.S. (1992) Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. **Marine Pollution Bulletin**, 25:48-50.

GUÉRIN, T.; SIROT, V.; VOLATIER, J.L. & LEBLANC, J.C. (2007) Organotin levels in seafood and its implications for health risk in high-seafood consumers. **Science of Total Environment**, 388(1-3): 66-77.

GURUGE, K.S.; IWATA, H.; TANAKA, H. & TANABE, S. (1997) Butyltin accumulation in the liver and kidney of seabirds. **Marine Environmental Research**, 44(2): 191-199.

HARINO, H; ARAI, T; OHJI, M; ISMAIL A.B; MIYAZAKI, N. (2009) Contamination Profiles of Antifouling Biocides in Selected Coastal Regions of Malaysia. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 56:468–478.

HOCH, M. (2001). Organotin compounds in the environment—an overview. **Applied Geochemistry**, 16, 719–743.

HORIGUCHI, T. ; SHIRAISHI, H. ; SHIMIZU, M. ; & MORITA, M.(1994) Imposex and Organotin Compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. **Journal Marine Biological Association U. K.**, 74: 651 – 669.

HORIGUCHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M.; S. YAMAZAKI & MORITA, M. (1995) Imposex in Japanese Gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda): effects of Tributyltin and Triphenyltin from antifouling paints. **Marine Pollution Bulletin**, 4(12): 402 – 405.

HORIGUCHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M. & MORITA, M. (1997a) – Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. **Environmental Pollution**, 95(I): 85–91.

HORIGUCHI, T. ; SHIRAISHI, H. ; SHIMIZU, M. ; & MORITA, M.(1997b) Imposex in Sea Snails, caused by Organotin (Tributyltin and Triphenyltin) Pollution in Japan: a Survey. **Applied Organometal Chemistry**, 11: 451 – 455.

HORIGUCHI, T.; HYEON-SEO, C.; SHIRAISHI, H.; SHIBATA, Y.; SOMA, M.; MORITA, M. & SHIMIZU, M. (1998a) Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. **The Science of the Total Environment**. 214: 65 – 70.

HORIGUCHI, T.; IMAI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIBATA, Y.; MORITA, M. & SHIMIZU, M. (1998b) Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk Abalone, *Haliotis discus discus* and the giant Abalone, *Haliotis madaka*. **Marine Environmental Research**, 46(1 – 5): 469 – 473.

HORIGUCHI, T.; LIB, Z.; UNOC, S.; SHIMIZU, M. SHIRAISHI, M; MORITA, M.; THOMPSON, J.A.J.; LEVINGS, C.D. (2003) Contamination of organotin compounds and imposex in molluscs from Vancouver, Canada. **Marine Environmental Research**, 57: 75–88.

HORIGUCHI, T.; KOJIMA, M.; HAMADA, F.; KAJIKAWA, A.; SHIRAISHI, H.; MORITA, M. & SHIMIZU, M. (2006) Impact of Tributyltin and Triphenyltin on Ivory Shell (*Babylonia japonica*) Populations. **Environmental Health Perspectives**, 114(1): 13-19.

HOTCHKISS, A.K.; STERNBERG, R.M. & LEBLANC, G.A. (2008) Environmental cues trigger seasonal regression of primary and accessory sex organs of the mud snail *Ilyanassa obsoleta*. **Journal of Molluscan Studies**, 74:301–303

HUET, M.; FIORINI, P.; OEHLMANN, J. & STROBEN, E. (1995) Comparison of imposex response in three Prosobanch species. **Hydrobiologia**. 309: 29 – 35.

HUET, M.; PAULET, M. & GLÉMAREC, M. (1996) Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of West Brittany as indicated by imposex in *Nucella lapillus*. **Marine Environmental Research**. 41(2): 157 – 167.

IMO - *International Maritime Organization*. (2008) **International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships**.

JANER, G.; STERNBERG, R.M.; LEBLANC, G.A. & PORTE, C. (2005) Testosterone conjugating activities in invertebrates: are they targets for endocrine disruptors? **Aquatic Toxicology**, 71:273–282.

JANER, G.; BACHMANN, J.; OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. & PORTE, C. (2006) The effect of organotin compounds on gender specific androstenedione metabolism in the freshwater ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 99:147–156.

JORUNDSÓTTIR, K.; SVAVARSSON, J. & LEUND, K.M.Y. (2005) Imposex levels in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)—continuing improvement at high latitudes. **Marine Pollution Bulletin**, 51: 744–749

KAN-ATIREKLAP, S.; TANABE, S. & SANGUANSIN, J. (1997a) Contamination by butyltin compounds in sediments from Thailand. **Marine Pollution Bulletin**. 34 (11): 894 – 899.

KAN-ATIREKLAP, S.; TANABE, S.; SANGUASIN, J.; TABUCANOM, M. S. & HUNGSPREUGS, M. (1997b) Contamination by butyltin compounds and

organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand coastal waters. **Environmental Pollution**, 97 (1 – 2): 79 – 89.

KOOL, S.P., (1993) Phylogenetic Analysis of the Rapaninae (Neogastropoda: Muricidae). **Malacologia**, 35 (2): 155-259.

KWOK, K.W.H.; LEUNG, K.M.Y. (2005) Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. **Marine Pollution Bulletin**, 51(8-12): 830-837.

LANGSTON, W.J. & POPE, N.D. (1995) Determinants of TBT Adsorption and Desorption in Estuarine Sediments **Marine Pollution Bulletin**, 31(1-3): 32-43.

LE, L.T. H.; TAKAHASHI, S.; SAEKI, K.; NAKATANI, N.; TANABE, S.; MIYAZAKI, N. & FUJISE, Y. (1999) High percentage of butyltin in total tin the livers of cetaceans from japonese coastal waters. **Environmental Science & Technology**. 33 (11): 1781 – 1786.

LEE, C.C; WANG, T.; HSIEH, C.Y.; TIEN, C.J. (2005) Organotin contamination in fishes with different living and its implications for human health risk in Taiwan. **Environmental Pollution**. 137(2): 198-208.

LIU, L.L. & SUEN, I. (1996) Organotins Promoting the Development of Imposex in the Oyster Drill *Thais clavigera*. **Journal Fish Society Taiwan**, 23(2): 149 – 154.

LIMA, A.F.A. (2004) Estudo dos efeitos da contaminação por organoestânicos, em fêmeas de *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Prosobranchia: Muricidae). Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIMA, A.F.A.; CASTRO, Í.B. & ROCHA-BARREIRA, C.A. (2006) Imposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. **Brazilian Journal of Oceanography**, 54(1): 85-90.

LIMA-VERDE, F.B.; CASTRO, I.B. & ROCHA-BARREIRA, C.A. (2010) Imposex occurrence in *Nassarius vibex* from South America: a potential bioindicator in estuarine environments. **Marine Biodiversity Records**, 3(e30): 1-4.

LIMAVERDE, A.M.; WAGENER, A.L.R.; FERNADEZ, M.A.; SCOFIELD, A.L. & COUTINHO, R. (2007) *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine Environmental Research**, 64: 384–3.

MAGALHÃES, C.A.; STRUCHI, P.P.; ASBAHR, M.(1997). Evidências de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* (gastropoda: prosobranchia) em áreas portuárias do estado de São Paulo. **Proceedings, COLACMAR**, Santos, São Paulo, Brasil, p.282.

MAIA, L.P.; JIMENEZ, J.A.; SERRA, J.; MORAIS, J.O. & SANCHEZ-ARCILLA, A. (1998) The Fortaleza (NE Brazil) waterfront: Port versus coastal management. **Journal of Coastal Research**, 14(4): 1284-1292.

MANZONI, G. C.; LACAVA, L. A. (1998) Crescimento dos *Gastropodes Thais (STRAMONITA) haesmastoma* (LINNAEUS, 1767) e *Cymatium P. partenopheum* (VON SALIS, 1793), em cultivo experimental na Enseada da Armação do Itapocoroy (PENHA-SC). **Notas Técnicas Facimar**, Itajaí, 2 (1), p. 167-173.

MATTHIESSEN, P. & GIBBS, P. E. (1998) Critical appraisal of the evidence for Tributyltin – mediated endocrine disruption in Mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 17(1): 37 – 43.

MCCLELLAN-GREEN, P.; ROMANO, J. & RITTSCHOF, D. (2006) Imposex Induction in the Mud Snail, *Ilyanassa obsoleta* by Three Tin Compounds. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 76: 581–588.

MENG, P.; HAN, B.; HSU, W.; CHUANG, A.; CHENG, J. & HUNG, T. (2003) Bioaccumulation and elimination of tributyltin and triphenyltin in oysters and rock shells in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**. 11(2), 96 – 101.

MENG, P.; WANG, J.; LIU, L.; CHEN, M. & HUNG, T. (2005) Toxicity and bioaccumulation of tributyltin and triphenyltin on oysters and rock shells collected from Taiwan mariculture area. **Science of Total Environment**, 39(1-3): 140-149.

MENSINK, B.P.; EVERAARTS, J.M.; KRALT, H. TEN HALLERS-TJABBES, C.C.; BOON, J.P. (1996) Tributyltin Exposure in Early Life Stages Induces the Development of Male Sexual Characteristics in the Common Whelk, *Buccinum undatum*. **Marine Environmental Research**, 42(1-4): 151-154.

MENSINK, B.P.; BOON, J.P.; HALLERS-TJABBES, C.C.T.; HATTUM, B.V. & KOEMAN, J.H. (1997) Bioaccumulation of organotin compounds and imposex

occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, the Netherlands). **Environmental Technology**, 18: 1235 – 1244.

MENSINK, B.P.; KRALT, H.; VETHAAK, A.D.; TEN HALLERS-TJABBES, C. KOEMAN, H.; VAN HATTUM, B. & BOON, J.P. (2002) Imposex induction in laboratory reared juvenile *Buccinum undatum* by tributyltin (TBT). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11: 49–65.

MINCHIN, D.; STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; BAUER, B.; DUGGAN, C. & KEATINGE, M. (1996). Biological Indicators Used to Map Organotin Contamination in Cork Harbour, Ireland. **Marine Pollution Bulletin**. 32(2): 188 – 195.

MINCHIN, A. & MINCHIN, D. (1997) Dispersal of TBT from a fishing port determined using the dogwhelk *Nucella lapillus* as an indicator. **Environmental Technology**, 38: 1225 – 1234.

MORA, S.J. & PHILLIPS, D.R. (1997) Tributyltin (TBT) pollution in riverine sediments following a spill from a timber treatment facility in Henderson, New Zealand. **Environmental Technology**, 18: 1187 – 1193.

MORCILLO, Y.; PORTE, C. (1998) Monitoring of organotin compounds and their effects in marine mollusks. **Trends in analytical chemistry**, 17(2): 109-116.

MORCILLO, Y.; ALBALAT, A. & PORTE, C. (1999) Mussels as sentinels of organotin pollution: Bioaccumulation and effects on P450 aromatase activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 18(6): 1203 – 1208.

MORENO, P. & CALLISTO, M. (2004) Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do Rio das Velhas. In: FERRACINI, V.L.; QUEIROZ, S.C.N. & SILVEIRA, M.P. (Org) **Bioindicadores de Qualidade da Água**. 1ª Ed. Jaguariuna: EMBRAPA. v.1, p.95-116.

MORTON, B. (2009) Recovery from imposex by a population of the dogwhelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda: Caenogastropoda), on the southeastern coast of England since May 2004: A 52-month study. **Marine Pollution Bulletin**, 58: 1530–1538.

OBERDÖRSTER, E.; RITSSCHOF, D. & MCCLELLAN-GREEN, P. (1998) Testosterone Metabolism in Imposex and Normal *Ilyanassa obsoleta*: Comparison of Field and TBTA CI-Induced Imposex. **Marine Pollution Bulletin**. 36(2): 144 151.

OBERDÖRSTER, E. & MCCLELLAN-GREEN, P. (2000) The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. **Peptides**, 21: 1323–30.

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

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

OHJI, M.; ARAI, T.; MIYAZAKI, N. (2005) Acute toxicity of tributyltin to the Caprellidea (Crustacea: Amphipoda). **Marine Environmental Research**, 59: 197–201.

OLIVEIRA, R.C. & SANTELLI, R.E. (2010) Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, 82(1): 9-24.

OSÓRIO, C. & HUAQUIN, L.G. (2003) Alteración de la sexualidad de *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) en la litoral de Chile central, inducida por compuestos organoestañosos. **Ciencia y Tecnología del Mar**, 26(2): 97 – 107.

OYEWO, E.O (1989) Organotin compounds, fouling and the marine environment. **Ocean & Shoreline Management**, 12: 285 – 294.

PAPP, M.G. e DUARTE, L.F.L., (2001) Locomotion of *Stramonita haemastoma* (Linnaeus)(Gastropoda, Muricidae) on a mixed shore of rocks and sand. **Revista Brasileira de Zoologia**, 18 (1): 187-195.

PELIZZATO, F.; CENTANNI, E.; MARIN, M.G.; MOSCHINO, V. & PAVONIA, B. (2004) Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. **Science of the Total Environment**, 332: 89– 100

PRUDENTE, M.; ICHIHASHI, H.; KAN-ATIREKLAP, S.; WATANABE, I. & TANABE, S. (1999) Butyltins, organochlorines and metal levels in green mussel, *Perna viridis* L. from the coastal waters of the Philippines. **Fisheries Science**. 65(3): 441–447.

QUEIROZ, L.R.; CASTRO, Í.B. & ROCHA-BARREIRA, C.A. (2007) New Imposex Development Index (IDI) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): A

Transplantation Experiment in the Brazilian Northeast. **Journal of Brazilian Society Ecotoxicology**, 2(3): 249-256.

QUINTELA, M.; BARREIRO, R. & RUIZ, J.M. (2002) Dumpton Syndrome reduces the tributyltin (TBT) sterilising effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of the imposed vas deferens. **Marine Environmental Research**, 54: 657–660.

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M; ASSIS, H.C.S; PELLETIER, E; AKAISHI, F.M; ANJOS, A; RANDI, M.A.F; RIBEIRO, C.A.O. (2005) Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60: 147–156.

REITSEMA, T.J.; THOMPSON, J.A.J.; SCHOLTENS, P. & SPICKETT, J.T. (2002) Further recovery of northeast Pacific neogastropods from imposex related to tributyltin contamination. **Marine Pollution Bulletin**, 44:257–261

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

RITTSCHOF, D. & MCCLELLAN-GREEN, P. (2005) Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. **Marine Pollution Bulletin**. v. 50, p. 369-373.

RODRIGUEZ, J.G; BORJA, A; FRANCO, J; ALONSO, I.G; GARMENDIA, J.M; MUXIKA, I; SARRIEGO, C; VALENCIA, V. (2009) - Imposex and butyltin body burden in *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867), in coastal waters within the Basque Country (northern Spain). **Science of the Total Environment**, 407: 4333–4339.

ROLLER, R.A. e STICKLE, W.B. (1988) Intracapsular development of *Thais haemastoma canaliculata* (Gray) (Prosobranchia: Muricidae) under laboratory conditions. **American Malacological Bulletin**, 6: 189–197.

RUIZ, J. M.; BACHELET, G.; CAUMETTE, P. & DONARD, O.F. X. (1996) Three decades of tributyltin in the coastal Environment with emphasis on Archacon Bay, France. **Environmental Pollution**, 93 (2): 195 – 203.

RUIZ, J.M.; BARREIRO, R.; COUCEIRO, L. & QUINTELA, M. (2008) - Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. **Chemosphere**, 73. 1253–1257.

RUIZ, J.M.; DÍAZ, J.; ALBAINA, N.; COUCEIRO, L.; IRABIEN, A. & BARREIRO, R. (2010) Decade-long monitoring reveals a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods. **Marine Pollution Bulletin**, 60: 931–934.

SANTOS, M.M.; TEN HALLERS-TJABBES, C.C.; SANTOS, A.M. & VIEIRA, N. (2002) Imposex in *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. **Journal of Sea Research**, 48(3): 217-223.

SANTOS, M.M.; CASTRO, L.F.C.; VIEIRA, M.N.; MICAEL, J.; MORABITO, R.; MASSANISSO, P. & REIS-HENRIQUES, M.A. (2005) New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 141(1): 101-109.

SANTOS, M.M.; REIS-HENRIQUES, M.A.; VIEIRA, M.N. & SOLE, M. (2006) Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. **Ecotoxicol Environ Saf** 64:155–162.

SENADO FEDERAL – Portal Atividade Legislativa. (2011) Disponível em: <http://www.senado.gov.br/atividade/plenario/sf/detResultado.asp?cs=1997> . Acesso em: 16/03/2011.

SIDHARTHAN, M.; YOUNG, K.S.; WOUL, L.H.; SOON, P.K. & SHIN, H.W. (2002) TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Marine Pollution Bulletin**, 45: 177–180.

SHIMASAKI, Y.; KITANO, T.; OSHIMA, Y. (2003) Tributyltin causes masculinization in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22 (1): 141-144.

SILVA, J.S.V.; FERNANDES, F.C.; SOUZA, R.C.C.L.; LARSEN, K.T.S. & DANELON, O.M. Água de lastro e bioinvasão, p. 1-10, in SILVA, J.S.V. & SOUZA, R.C.C.L. (eds.), *Água de lastro e bioinvasão*. Editora Interciência, 224p., Rio de Janeiro, 2004.

SMITH, B. S. (1971) Sexuality in the American mud-snail *Nassarius obsoletus* Say. **Proceedings of Malacology Society**, London, 39: 377 – 378.

SMITH, B. S. (1981) Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. **Journal of Applied Toxicology**. 1(3): 141 - 144

SMITH, P.J. (1996) Selective decline in imposex levels in the dogwhelk *Lepsiella scorbina* following a ban on the use of TBT antifoulants in New Zealand. **Marine Pollution Bulletin**, 32(4): 362 – 365.

SOUSA, A.; MENDO, S. & BARROSO, C. (2005) Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 19, p. 315-323.

SOUSA, A.; LARANJEIRO, F.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S. & BARROSO, C.M. (2009) Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. **Chemosphere**, 77: 566–573.

SPOONER N.; GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. & GOAD, L.J. (1991) The effects of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. **Marine Environmental Research**, 32:37–49.

STERNBERG, R.M. & LEBLANC, G.A. (2006) Kinetic analyses of the inhibition of acyl coenzyme A: steroid acyltransferases in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*) by tributyltin. **Aquatic Toxicology**, 78:233–242.

STERNBERG, R.M.; HOTCHKISS, A.K. & LEBLANC, G.A. (2008) The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. **General and Comparative Endocrinology**, 156:15–26.

STERNBERG, R.M.; GOODING, M.P.; HOTCHKISS, A.K. & LEBLANC, G.A. (2010) Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin induced imposex in prosobranchs. **Ecotoxicology**, 19:4–23.

STEWART, C., DE MORA, S.J., JONES, M.R.L. & MILLER, M.C. (1992). Imposex in New Zealand neogastropods. **Marine Pollution Bulletin**, 24, 204-209.

STEWART, C. & MORA, S.J. (1992) Elevated tri(n-butyl)tin concentrations in shellfish and sediments from Suva Harbour, Fiji. **Applied Organometallic Chemistry**, 6: 507 – 512.

STEWART, C. & THOMPSON, A.G. (1997) Vertical distribution of butyltin residues in sediments of British Columbia harbours. **Environmental Technology**, 18: 1195 – 1202.

STICKLE, W.B.; SHARP-DAHL, J.L.; RICE, S.D. AND SHORT, J.W. (1990) Imposex induction in *Nucella lima* (Gmelin) via mode of exposure to tributyltin **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 143(3): 165-180.

STRAND, J. & ASMUND, G. (2003) Tributyltin accumulation and effects in marine molluscs from West Greenland. **Environmental Pollution**, 123:31–37

STRAND, J.; LARSEN, M.M; LOCKYER, C. (2005) Accumulation of organotin Compounds and mercury in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Danish waters and West Greenland. **Science of the Total Environment**, 350(1-3): 59-71.

STRAND, J.; JØRGENSEN, A. & TAIROVA, Z. (2009) TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea. **Environment International** 35: 707–711.

TAKEUCHI, I.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S., & MIYAZAKI, N. (2004) Butyltin concentrations along the Japanese coast from 1997 to 1999 monitored by *Caprella* spp. (Crustacea: Amphipoda). **Marine Environmental Research**, 57, 397–414.

TAN, K.S. (1997) Imposex in Three Species of *Thais* from Singapore, with Additional Observations on *T. clavigera* (Kuster) from Japan. **Marine Pollution Bulletin**. 34(7): 577 – 581.

TANABE, S.; PRUDENTE, M.; MIZUNO, T.; HASEGAWA, J.; IWATA, H. & MIYAZAKI, N. (1998) Butyltin contamination in marine mammals from North Pacific and Asian coastal waters. **Environmental Science & Technology**. 32 (2): 193 – 198.

TANABE, S. (1999) Butyltin contamination in marine Mammals – a Review. **Marine Pollution Bulletin**. 39(1 – 12): 62 – 72.

Ten HALLERS-TJABBES, C.C.T.; KEMP, J.F. & BOOM, J.P. (1994) Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. **Marine Pollution Bulletin**. 28(5): 311 – 313.

Ten HALLERS-TJABBES, C.C.T.; EVERAARTS, J. M.; MENSINK, B. P. & BOON, J. P. (1996) The decline of the North Sea whelk (*Buccinum undatum* L.) between 1970 and 1990: A natural or a human-induced event? **Marine ecology**. 17(1-3): 333 – 343.

Ten HALLERS-TJABBES, C.C.T.; WEGENER, J.; HATTUN, V.B.; KEMP, J.F.; TEM HALLERS, E.; REITSEMA, T.J. & BOON, J.P. (2003). Imposex and organotin

concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. **Marine Environmental Research**. 55: 203 – 233.

TESTER, M. & ELLIS, D.V. (1995) TBT Controls and the Recovery of Whelks from Imposex. **Marine Pollution Bulletin**, 30(1): 90-91.

TESTER, M. ; ELLIS, D. V. & THOMPSON, J. A. J. (1996) Neogastropods Imposex for monitoring recovery from marine TBT contamination. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 15(4): 560–567.

THIBAUT, R.; PORTE, C. (2004) Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 92: 485–494.

TODD, C.D., LAMBERT, W.J. e THORPE, J.P. (1998) The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic stages: are pelagic larvae “for” dispersal? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 228: 1-28.

UDELSMAN, B. (2009) Estudo populacional de *Stramonita haemastoma* (Gastropoda, Prosobranchia) Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 185p.

VASCONCELOS, P.; MOURA, P.; BARROSO, C.M. & GASPAR, M.B. (2011) Size matters: importance of penis length variation on reproduction studies and imposex monitoring in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). **Hydrobiologia**, 661: 363–375.

WADE, T.L.; GARCIA-ROMERO, B. & BROHS, J.M. (1991). Oysters as biomonitors of butyltins in the Gulf of Mexico. **Marine Environmental Research**, 32: 233-241.

WADE, T.L.; SWEET, S.T.; QUINN, J.; CAIRNS, R.W. & KING, J.W. (2004) Tributyltin in environmental samples from the Former Derecktor Shipyard, Coddington Cove, Newport. **Environmental Pollution**, 129: 315–320

WAITE, M.E.; WALDOCK, M.J.; THAIN, J.E.; SMITH, D.J. & MILTON, S.M. (1991). Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987. **Marine Environmental Research**, 32, 89-111.

WALDOCK, M.J.; THAIN, E.J. & WAITE, M.E. (1995). An assessment of the value of shell thickening in *Crassostrea gigas* as an indicator of exposure to tributyltin. **Organotin**, 220 – 237.

WALDOCK, R.; REES, H. L.; MATTHIESSEN, P. & PENDLE, M.A. (1999) Survey of benthic of the Crouch estuary (U.K.) in relation to TBT contamination. **Journal of Marine Biological Association**. 79: 225–232.

WANG, X.; FANG, C.; HONG, H. & WANG, W. (2010) Gender differences in TBT accumulation and transformation in *Thais clavigera* after aqueous and dietary exposure **Aquatic Toxicology**, 99:413–422.

WESTON, D.P. & MARUYA, K.A. (2002) Predicting bioavailability and bioaccumulation with in vitro digestive fluid extraction. **Environmental Toxicology Chemistry**. 21: 962-971.

YAMADA, J.; INOUE, K.; FURUKAWA, T. & FUKUDA, A. (2010) Low-concentration tributyltin perturbs inhibitory synaptogenesis and induces neuronal death in immature but not mature neurons. **Toxicology Letters**, 198(2): 282-288.

ZHENGYAN, L.I. (2005) Seasonal variation in imposex intensity of *Thais clavigera*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 23(2): 163-168.