



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal



GABRIELA CALVI ZEIDAN

EFEITO DO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT) SOBRE *STRAMONITA RUSTICA* (NEOGASTROPODA) E *LITTORARIA ANGULIFERA* (MESOGASTROPODA)

ILHÉUS – BAHIA

2017

GABRIELA CALVI ZEIDAN

EFEITO DO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT) SOBRE *STRAMONITA RUSTICA* (NEOGASTROPODA) E *LITTORARIA ANGULIFERA* (MESOGASTROPODA)

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Orientadora: Profa. Dra. Guisla Boehs

Co-orientador: Dr. Carlos Miguel Barroso

ILHÉUS-BAHIA

2017

Z45

Zeidan, Gabriela Calvi.

Efeito do Tributílo-estanho (TBT) sobre *Stramonita rustica* (Neogastropoda) e *Littoraria angulifera* (Mesogastropoda) / Gabriela Calvi Zeidan. – Ilhéus, BA: UESC, 2017.

xvii, 183f. : il. ; anexos.

Orientador: Guisla Boehs.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências e apêndice.

1. Gastrópodes. 2. Indicadores biológicos. 3. Compostos organoestanho. 4. Contaminação ambiental. 5. Testes de toxicidade. I. Título.

CDD 594.3

GABRIELA CALVI ZEIDAN

EFEITO DO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT) SOBRE *STRAMONITA RUSTICA* (NEOGASTROPODA) E *LITTORARIA ANGULIFERA* (MESOGASTROPODA)

Ilhéus (BA), 21/07/2017

Dra. Guisla Boehs

UESC/DCB

(Orientadora)

Dr. Alexandre Schiavetti

UESC/DCAA

Dr. Eduardo Mendes da Silva

UFBA/Instituto de Biologia

Dr. Pedro Augusto Mendes de Castro Melo

UFPE/DO

Dr. Rodolfo Mariano Lopes da Silva

UESC/DCB

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquela que permitiu que o sonho se realizasse, confiou e acreditou em mim, até quando eu mesma não acreditava mais...

Professora Dra. Guisla Boehs

AGRADECIMENTOS

À Profa. Guisla Boehs, por toda base intelectual e estrutural, por confiar nas minhas ideias, pelo apoio incondicional, companheirismo, paciência, amizade, carinho, senso de justiça, sacolejos, fé, profissionalismo e por me ensinar muito mais que conhecimentos acadêmicos e científicos. Obrigada por ter me dado asas e ter me conduzido neste caminho, muitas vezes bem difícil, mas sempre muito prazeroso, que levou a conclusão desta tese e a continuidade de um elo permanente: de família. Me espelho em ti quando penso em evolução profissional e humana. Nenhum agradecimento seria suficiente para expressar toda admiração, carinho e respeito que tenho por você. Obrigada por tudo e por todas as oportunidades em todos os sentidos dessa vida. Essa tese é para você.

Ao professor Dr. Carlos Miguez, pelo conhecimento compartilhado, pelo incentivo, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, pelas ideias que mudaram o rumo desta tese e por ser um referencial de pesquisador e ser humano para mim. Foi um prazer enorme conviver contigo no Brasil e em Portugal e muito enriquecedor para minha vida em todos os aspectos. Obrigada por todas as contribuições como pesquisador, por aguçar meu raciocínio científico, e pela querida amizade, que carrego para a vida. És uma das pessoas mais queridas, humanas e profissionais que já tive oportunidade de conhecer e conviver.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de doutorado e à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado Sanduíche.

À FAPESB, através do Projeto TSC0010/2011 e à UESC, através do Projeto PROPP 00220.1100.1478, pelo financiamento do estudo.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação, professores Alexandre Schiavetti e Wesley da Rocha, da UESC, assim como aos membros da banca de defesa da Tese, professores Alexandre Schiavetti (UESC), Pedro Melo (UFPE), Eduardo Mendes (UFBA) e Rodolfo Mariano (UESC) por terem aceitado participar das bancas e pelas contribuições ao trabalho e à minha formação.

Às “minhas meninas”, que no início deste trabalho eram estagiárias de Iniciação Científica e hoje são minhas colegas de curso, Leonice e Gláucia. Sem vocês duas, eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada pelo auxílio sempre a postos, comprometimento, profissionalismo, amizade para todos os momentos, risos, lágrimas, conhecimentos compartilhados e por criarem comigo essa tese.

Ao Neto, que chegou mais tarde na equipe, mas não menos comprometido e companheiro. Obrigada pela ajuda, amizade, pelas horas no laboratório de

histologia, pelas ideias científicas de uma pessoa com grande acurácia para biologia. Foi uma satisfação conviver contigo.

Às meninas do Laboratório de Moluscos Marinhos, Verena e Mari. Pela convivência, conversas e ajuda dentro e fora da Universidade. Foram momentos únicos e que guardarei comigo sempre.

À toda “equipa” do Laboratório de Ecologia Marinha e Estuarina – LEME da Universidade de Aveiro, Susana, Sofia, Ana Hilário, Belucha, Luciana, Rita, Mariana, Patrícia e Fábio. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, convívio diário melhor impossível, carinho, amizade e por tudo que aprendi. A brasileira vos leva no coração sempre, independente do lugar do mundo.

À Susana Galante em especial, por todo acompanhamento ao longo deste período do doutoramento, quer fosse no laboratório ou fora dele. Muito obrigada por ter me ensinado todas as técnicas, a paciência que teve comigo em todos os processos do início ao fim em Portugal (e depois da volta também), a ter me ensinado tudo com tanta atenção, detalhamento, profissionalismo e sempre de prontidão. Nunca seria suficientemente possível agradecê-la por tudo que foi para mim neste período em Portugal. Obrigada pelo apoio, acolhimento, conversas, cuidado e amizade em todos os aspectos e em todos os momentos (inclusive os mais difíceis). Portugal não teria sido o mesmo sem ti. Guardo-te para sempre comigo, tudo que me ensinaste e o que cativaste. Obrigada, guaja.

À professora Clea Mariano, por sempre ter me permitido utilizar a estrutura do seu laboratório.

À equipe do Laboratório de Oceanografia Química e Ecologia Bêntica da UESC, que sempre que necessário, não mediram esforços para ajudar com recursos e conhecimentos.

À Fernanda Jordão, pela amizade de longa data e embora nem sempre presentes, inabalável e fortificada. Obrigada por tudo, em todos os momentos e pelos ensinamentos estatísticos (mais que inconvenientes de domingo a noite).

À Dra. Mércia, pela ajuda, ensinamentos, treinamento ecotoxicológico no Laboratório de Malacologia da UFES, amizade e por todo apoio nesta ciência linda e ao longo da vida, durante esses anos de convivência. Muito grata a ti!

Às comunidades de Campinhos (Canavieiras) e Cajaíba (Baía de Camamu), por todo apoio em campo e principalmente pelo conhecimento compartilhado. Nenhum título é capaz de mensurar o valor de conviver com pessoas como vocês. Este trabalho é por todos vocês.

Aos meus colegas de doutorado, em especial ao Francisco, pela disponibilidade e cumplicidade durante este doutorado.

Aos amigos mais que especiais, que nos momentos mais complicados, estiveram comigo e me mostraram o verdadeiro valor da palavra amizade: João Elias e família, Tatiane Bezerra, Taiana Guimarães (desde sempre!) e Viviane Bríccia. Minha eterna gratidão e amizade.

Aos grupos Amigos da Luz e Virtude e Fé, pela caminhada ao rumo de nos tornarmos pessoas melhores para conosco, com o próximo e com o mundo.

Ao Suri, onde quer que esteja... obrigada por ter sido meu companheiro por todos esses anos e momentos. Foi um dos maiores presentes ter vivido contigo.

À minha base, minha família. Por terem me conduzido e me amparado neste percurso da vida com muita dignidade, honestidade e coragem, me ensinando que independentemente de onde você possa chegar nessa vida, a lembrar-me de onde vim e que com trabalho e esforço, podemos alcançar os mais altos degraus, que a humildade, respeito e educação são grandes virtudes e que devemos ter com todas as pessoas, que as coisas mais valorosas dessa vida são as mais simples, como uma refeição quentinha, um passeio no pôr do sol ou apenas um sorriso, traduzido em “conte sempre comigo, sempre estarei aqui por você”, como de fato sempre estiveram. Minha mãe Isamara, pai Afif, avó Onélia e avô Germínio (*in memoriam*). Sem vocês, nada seria. Por vocês, movo o mundo. Obrigada pela vida, pelos princípios, caráter e apoio incondicional em todas as etapas desta e de todas as jornadas (muitas vezes malucas) da minha vida. O doutorado foi mais uma consequência de tudo isso. Vocês são minhas razões de viver e de querer ser alguém melhor a cada dia.

A Deus, por ser perfeito em todas suas obras. Por me permitir interpretar seus desígnios e seguir meu caminho, que, através de todos os erros e imperfeições, lições valiosas foram aprendidas. A máxima existe: “Ajuda-te que o céu te ajudará”.

EFEITO DO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT) SOBRE *STRAMONITA RUSTICA* (NEOGASTROPODA) E *LITTORARIA ANGULIFERA* (MESOGASTROPODA)

RESUMO

O tributilestanho (TBT) é um composto organoestânico (COEs) utilizado como biocida em tintas antiincrustantes (AI) para o controle do *fouling* em embarcações e superfícies submersas. É altamente tóxico aos ecossistemas aquáticos e aos organismos não alvo e, apesar do banimento mundial em 2008, continua sendo amplamente utilizado no Brasil. Em gastrópodes, o TBT atua como disruptor endócrino. Em neogastrópodes provoca a sobreposição de caracteres sexuais masculinos sobre o trato reprodutivo das fêmeas, alteração conhecida por *Imposex*, sendo este o bioindicador mais usado para esse tipo de contaminação. Em mesogastrópodes pode ocorrer uma transformação gradual do oviduto palial das fêmeas em caracteres reprodutivos masculinos, alteração denominada de *Intersex*. No litoral sul da Bahia há diversas atividades náuticas potenciais de contaminação por TBT, como portos, estaleiros e marinas. Até o momento, não havia sido registrada a contaminação por TBT neste trecho do litoral. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar áreas potencialmente contaminadas por COEs, utilizando, na primeira etapa, o neogastrópode *Stramonita rustica* como bioindicador e sequencialmente o mesogastrópode *Littoraria angulifera*, espécie estritamente estuarina. Com esta última realizou-se, além de estudos *in situ*, bioensaios, com o fim de propor um novo protocolo para avaliação da contaminação por COEs nos estuários. As coletas, processamentos laboratoriais e ensaios foram feitos durante três anos (2014-2016), com amostragem em 30 locais e análise de um total de 1.856 exemplares (*S. rustica*: n = 330; *L. angulifera*: n = 1.526). Os animais foram anestesiados com Cloreto de Magnésio (MgCl) e as conchas foram medidas e quebradas para análise dos parâmetros sexuais de cada espécie. Foi confirmado o uso do TBT em áreas com portos, atividades de manutenção de pequenas embarcações e docas no litoral sul da Bahia, através do indicador *Imposex* em *S. rustica*. Os atributos populacionais, reprodutivos e comportamentais analisados em populações de *L. angulifera*, evidenciaram reprodução contínua, diferenças morfométricas entre os sexos e diferenças na altura da concha entre locais antropizados e não antropizados. Esses resultados serviram como subsídio para a avaliação do efeito do TBT nessa espécie e a utilização da mesma como organismo teste para contaminação por esse organometal. Para testar e confirmar as alterações sexuais causadas pelo TBT em fêmeas de *L. angulifera* através de bioensaios, foi inicialmente determinado o melhor anestésico e a concentração mais eficiente, sendo que o MgCl a 10% atendeu aos critérios (indução ao relaxamento, recuperação e sobrevivência pós anestesia), após, dois bioensaios foram conduzidos: (i) via dieta contaminada com TBT em papel A4 (utilizando duas concentrações de TBTCl e duas classes de tamanho) e (ii) via injeção com o contaminante, onde os animais foram anestesiados, inoculados com TBTCl a 4µg/g do espécime. As análises morfométricas foram feitas em microscópio estereoscópico. Os resultados foram comparados aos de *L. angulifera* de locais contaminados por TBT (em que se fez também análise química de sedimento) e de um sítio controle. Alterações morfométricas sexuais foram confirmadas em ambos os ensaios. Os parâmetros analisados (comprimento do oviduto palial e distância entre a abertura anal e a vulva) nos animais contaminados assemelharam-se com a biometria do aparelho reprodutor masculino, evidenciando alteração sexual. Dessa forma, este estudo confirmou: (i) a utilização de tintas antincrustantes à base de TBT no litoral sul da Bahia através do bioindicador *S. rustica* e da análise do sedimento; (ii) que *L. angulifera* obedece aos critérios de escolha para organismo teste em estudos de contaminação ambiental; (iii) que *L. angulifera* sofre alterações sexuais em decorrência de exposição ao TBT; (iv) que o alongamento do oviduto palial, uma das alterações observadas, pode comprometer a eficiência reprodutiva das populações; (v) que novos estudos relacionados à contaminação ambiental utilizando *L. angulifera* e os parâmetros biométricos aqui empregados serão importantes para a proposição final desta espécie como organismo sentinela para contaminação por TBT em ambientes estuarinos.

Palavras-chave: Alteração sexual, bioindicadores, compostos organoestânicos, morfometria

EFFECT OF TRIBUTYL-TIN CONTAMINATION (TBT) IN *Stramonita rustica* AND *Littoraria angulifera*

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an organostannic compound (OC) used as a biocide in antifouling paints (AI) to prevent bioincrustation in vessels and submerged surfaces. It is highly toxic to aquatic environment and to non-target organisms. Despite the worldwide ban in 2008, it still widely used in Brazil. In gastropods, TBT acts as an endocrine disruptor. In neogastropods it's causes the superimposition of male sexual characters onto females reproductive tract, called Imposex, it was been the bioindicator most used for this type of contamination. In mesogastropods, occurs a gradual transformation of female palial oviduct in reproductive masculine characters, denominated Intersex. The southern coast of Bahia has a several nautical activities that are potentially source of contamination by TBT, such as ports, shipyards and marinas. To date, TBT contamination has not been recorded on this stretch of coast. In this way, this study aimed to evaluate areas potentially contaminated by OC's, using, in the first stage, the neogastropod *Stramonita rustica* as bioindicator and sequentially the mesogastropod *Littoraria angulifera*, a strictly estuarine species. With this last one, in addition to wild studies, bioassays were carried out, in order to propose a new protocol for evaluation of OC's contamination in estuaries. The samples, laboratory procedures and bioassays were made during three years (2014-2016), in 30 stations samples where were analyzed a total of 1,856 specimens (*S. rustica*: n = 330; *L. angulifera*: n = 1,526). The animals were anesthetized with Magnesium Chloride (MgCl) and the shells were measured and broken to analyze the sexual parameters of each species. Through the indicator Imposex in *S. rustica*, the use of TBT in areas with ports, maintenance activities of small vessels and docks were confirmed in the southern coast of Bahia. Attributes in *L. angulifera* populations, such as populational, reproductive and behavioral were analyzed and showed continuous reproduction, morphometric differences between the sexes and differences in shell height between anthropized and non- anthropized sites. These results served as a subsidy for evaluating the effect of TBT in this species and its use as a test organism for contamination by this organometal. To test and confirm the sexual changes caused by TBT in *L. angulifera* females through bioassays, initially were determined the best anesthetic and the most efficient concentration for *L. angulifera*, and the 10% MgCl met the criteria (induction to relaxation, recovery and survival after anesthesia). After, two bioassays were conducted: (i) through a contaminated diet with TBT on A4 paper (using two concentrations of TBTC1 and two size classes) and (ii) through injection with contaminant, where the animals were anesthetized, inoculated with TBTC1 at 4µg / g of each specimen. Morphometric analyzes were performed under a stereoscopic microscope. The results were compared to those *L. angulifera* from sites contaminated by TBT (in which chemical sediment analysis was also done) and from a control site. Sexual morphometric changes were confirmed in both bioassays. The analyzed parameters (palial oviduct length and distance between anal opening to vulva) in the intoxicated animals resembled the biometry of the male reproductive tract, evidencing sexual alteration. Thus, this study confirmed: (i) the use of TBT-based antifouling paints on the southern coast of Bahia confirmed through the bioindicator *S. rustica* and the sediment analysis; (ii) *L. angulifera* follows the criteria of choice for test organisms in environmental contamination studies; (iii) *L. angulifera* undergoes sexual changes as a result of exposure to TBT; (iv) the elongation of the palial oviduct, one of the observed changes, can compromise the reproductive efficiency of the populations; (v) and new studies related to environmental contamination using *L. angulifera* and the biometric parameters used here will be important for the final proposal of this species as a sentinel organism for TBT contamination in estuarine environments.

Key words: Sexual alteration, bioindicators, organotin compounds, morfometry.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.** Áreas avaliadas por *Imposex* em gastrópodes (∇) e contaminação por organoestânicos em sedimentos (≡) e mamíferos marinhos (▲) da costa sul-americana (Fonte: CASTRO et al., 2012)..... 22

Capítulo 1

PANORAMA DA CONTAMINAÇÃO E DO MONITORAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO (COEs): HISTÓRICO E PERSPECTIVAS DE AVALIAÇÃO

- Figura 1.** Compostos orgânicos de estanho. O X indica o anel covalente, como cloreto, óxido e hidróxido (Fonte: SANTOS et al., 2011)..... 32
- Figura 2.** Concha de *Littoraria angulifera*. A: Vista dorsal. B: Vista anterior mostrando a abertura do opérculo..... 49

Capítulo 2

ASSESSMENT OF TRIBUTYLTIN CONTAMINATION BASED ON IMPOSEX IN *Stramonita rustica* (MOLLUSCA: GASTROPODA) ALONG SOUTHERN BAHIA COAST, NORTHEASTERN BRAZIL

- Figura 1.** Mapa mostrando os pontos amostrais ao longo da Costa Sul da Bahia..... 68
- Figura 2.** Pontos monitorados na Costa Sul do estado da Bahia, indicando os pontos amostrais, locais de atividade náutica e alterações sexuais..... 69

Capítulo 3

EFICIÊNCIA DE ANESTÉSICOS SOBRE O GASTRÓPODE *Littoraria angulifera*

- Figura 1.** Porcentagem cumulativa de fêmeas de *Littoraria angulifera* totalmente anestesiadas após a exposição ao Cloreto de Magnésio (MgCl₂) às concentrações de 4%, 7% e

10%.....	83
Figura 2. Porcentagem cumulativa de <i>Littoraria angulifera</i> totalmente recuperada após a exposição ao MgCl ₂ em diferentes concentrações.....	85
Capítulo 4	
MORFOLOGIA, RECRUTAMENTO E COMPORTAMENTO DE <i>Littoraria angulifera</i> NA COSTA NORDESTE DO ATLÂNTICO SUL, BRASIL	
Figura 1. Estações de coleta (St=•) de coleta de <i>Littoraria angulifera</i> ao longo do litoral sul do estado da Bahia, Brasil.....	99
Figura 2. Valores da temperatura (°C) (•) e da salinidade (PSU: "practical salinity unit") (■) da água na Barra do Sargi, Uruçuca, Bahia, medidas mensalmente (13 meses) entre agosto de 2015 e agosto de 2016.....	102
Figura 3. Morfologia de <i>Littoraria angulifera</i>	105
Figura 4. Resultados gráficos das correlações entre parâmetros morfométricos em <i>Littoraria angulifera</i>	106
Figura 5. Proporção sexual (%) de <i>Littoraria angulifera</i> em 22 locais do litoral da Bahia, Brasil ($n = 880$).....	109
Figura 6. Frequência de tamanho (altura) (%) de <i>Littoraria angulifera</i> do litoral da Bahia, Brasil, de agosto de 2015 a agosto de 2016 ($n = 3.900$)....	110

Capítulo 5

UTILIZAÇÃO DE *Littoraria angulifera* (GASTROPODA) COMO ORGANISMO-TESTE PARA A CONTAMINAÇÃO PELO

ORGANOESTÂNICO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT)

Figura 1. Pontos de amostragem de <i>Littoraria angulifera</i> no litoral sul do estado da Bahia, Brasil.....	130
Figura 2. Aspecto de uma caixa utilizada no Ensaio I - Via alimentação por papel contaminado com Cloreto de Tributil-Estanho (TBT) em solução de DMSO e não contaminado (controles contendo apenas água do mar ou solvente DMSO.....	132
Figura 3. Injeção de DMSO, ensaio II.....	134
Figura 4. Morfometria do aparelho reprodutivo de <i>Littoraria angulifera</i> ...	137
Figura 5. Gráficos Box-Plot para os valores do comprimento do oviduto palial (COP) e da distância entre a abertura do ânus a vulva (DAV) nos três tratamentos.....	138

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

PANORAMA DA CONTAMINAÇÃO E DO MONITORAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO (COEs): HISTÓRICO E PERSPECTIVAS DE AVALIAÇÃO

Tabela 1. Efeitos tóxicos causados a diversos organismos aquáticos submetidos a diferentes concentrações de TBT..... 38

Tabela 2. Espécies de gastrópodes prosobrânquios utilizadas mundialmente para biomonitoramentos..... 42

Capítulo 2

ASSESSMENT OF TRIBUTYLTIN CONTAMINATION BASED ON IMPOSEX IN *Stramonita rustica* (MOLLUSCA: GASTROPODA) ALONG SOUTHERN BAHIA COAST, NORTHEASTERN BRAZIL

Tabela 1. Dados de *Imposex* em *Stramonita rustica* na Costa Sul do estado da Bahia, Brasil..... 70

Tabela 2. Resultados da análise de Kruskal-Wallis sobre o comprimento do pênis de *Stramonita rustica* entre machos e fêmeas e entre os pontos amostrais..... 72

Capítulo 3

EFICIÊNCIA DE ANESTÉSICOS SOBRE O GASTRÓPODE *Littoraria angulifera*

Tabela 1. Resultados, em números absolutos (indivíduos), do teste de eficiência anestésica de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) em *Littoraria angulifera* nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos nas concentrações de 4, 7 e 10%. I = não anestesiados; II = parcialmente anestesiados; III - totalmente anestesiados; (a) animais do grupo dos não anestesiados; (b) parcialmente recuperados; (c) totalmente recuperados. n =60..... 84

Capítulo 4

MORFOLOGIA, RECRUTAMENTO E COMPORTAMENTO DE *Littoraria angulifera* NA COSTA NORDESTE DO ATLÂNTICO SUL, BRASIL

Tabela 1. Resultados da ANOVA unifatorial da comparação morfométrica dos caracteres sexuais de *Littoraria angulifera* no litoral do estado da Bahia (Brasil). *F* e *H*: valores dos testes. *p*: probabilidade de erro α ; *n* = 514. CP= Comprimento da próstata; COP= Comprimento do oviduto palial; DAV = Distância entre o ânus e a vulva; DPA= Distância entre a próstata e o ânus..... 108

Tabela 2. Resultados da ANOVA unifatorial da comparação da altura da concha de *Littoraria angulifera* no litoral do estado da Bahia (Brasil), entre as estações de coleta e entre os sexos. *F*: valor do teste. *p*: probabilidade de erro α ; *n* = 880..... 109

Capítulo 5

UTILIZAÇÃO DE *Littoraria angulifera* (GASTROPODA) COMO ORGANISMO-TESTE PARA A CONTAMINAÇÃO PELO ORGANOESTÂNICO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT)

Tabela 1. Biometria das fêmeas de *Littoraria angulifera* analisadas de três locais potencialmente contaminados por TBT no sul da Bahia (A1, A2 e A3) e de um ambiente controle (A0). A0 = Controle negativo do ambiente; A1 = Atracadouro; A2 = Estaleiro; A3 = Marina. *n* total = 142..... 129

Tabela 2. Ensaio com *Littoraria angulifera* via dieta contaminada com TBT em papel A4. T0 - Tratamento Controle com água do mar; T1 - Tratamento Controle com Dimetil sulfóxido (DMSO); T2 - Tratamento com cloreto de TBT a 0,5µg/L; T3 - Tratamento com cloreto de TBT a 1,0µg/L de TBT diluído em DMSO. *n*= 384..... 132

Tabela 3. Biometria das fêmeas de *Littoraria angulifera* analisadas no Ensaio II, via injeção com Dimetil sulfóxido (DMSO) (E1) e por cloreto de Ttributil-

estanho (E2). n total: 133
 120.....

Tabela 4. Dados referentes à sobrevivência e à sensibilidade ao TBT nos ensaios realizados com *Littoraria angulifera*. DMSO = Dimetil sulfóxido; TBT= Tributuil- 135
 estanho.....

Tabela 5. Ensaio I – via dieta: sobrevivência, altura da concha (AC), peso (P), comprimento do oviduto palial (COP), distância entre o ânus e a volta (DAV), total de papel consumido (PC) e volume de soluto/reagente final absorvido (VC). T0= Controle negativo com água do mar (15-16 mm); T0a = Controle negativo com água do mar (19-20 mm); T1= Controle negativo com solução de DMSO; T1a = Controle negativo com solução de DMSO 19-20 mm; T2 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm) T2a= Tratamento TBT 1µg/L-(19-20 mm); T3 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm); T3a 1µg/L g (19-20 mm). AC = altura da concha (mm); PC = papel consumido (mm²); VC = volume consumido (mm³); P = peso (g). Biometria expressa em médias/desvio padrão..... 135

Tabela 6. Valores das médias e desvios padrões dos parâmetros morfométricos nos seis tratamentos do ensaio II. Controle; E1 – Controle DMSO; E2 – Injeção TBT; A1 – Atracadouro; A2 – Estaleiro; A3 - Marina. AC = altura da concha (mm); P = peso (g), COP = comprimento do oviduto palial (mm); DAV = distância entre o ânus e a vulva (mm). Biometria expressa em médias/desvio padrão..... 136

Tabela 7. Resultados do teste *t* (*t*) e seu representante não paramétrico Mann-Whitney (U*) das comparações dos parâmetros analisados no Ensaio I (dieta enriquecida com TBTCl). COP= Comprimento do oviduto palial; DAV= Distância entre o ânus e a vulva; T1= Controle negativo com solução de DMSO; T1a = Controle negativo com solução de DMSO 19-20 mm; T2 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm) T2a= Tratamento TBT 1µg/L (19-20 mm); T3 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm); T3a 1µg/L (19-20 mm)..... 137

Tabela 8. Resultados do teste t (t) e seu representante não paramétrico Mann-Whitney (U^*) das comparações dos parâmetros analisados do controle com as demais estações. AC= Altura da concha; A1= Atracadouro, A2= Estaleiro, A3= Marina; COP= Comprimento do oviduto palial; DAV= Distância entre o ânus e a vulva, DMSO= Controle negativo com Dimetil sulfóxido..... 138

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	25
Geral.....	25
Específicos.....	25
Referências bibliográficas.....	26
CAPÍTULO 1.....	29
PANORAMA DA CONTAMINAÇÃO E DO MONITORAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO (COEs): HISTÓRICO E PERSPECTIVAS DE AVALIAÇÃO	
CAPÍTULO 2.....	63
ASSESSMENT OF TRIBUTYL TIN CONTAMINATION BASED ON IMPOSEX IN <i>Stramonita rustica</i> (MOLLUSCA: GASTROPODA) ALONG SOUTHERN BAHIA COAST, NORTHEASTERN BRAZIL	
Introdução.....	65
Materiais e métodos.....	66
Resultados e discussão.....	69
Referências.....	73
CAPÍTULO 3.....	77
EFICIÊNCIA DE ANESTÉSICOS SOBRE O GASTRÓPODE <i>Littoraria</i> <i>angulifera</i>	
Introdução.....	79
Materiais e métodos.....	81
Resultados.....	82
Discussão.....	85
Conclusão.....	87
Referências.....	87
CAPÍTULO 4.....	92

MORFOLOGIA, RECRUTAMENTO E COMPORTAMENTO DE <i>Littoraria angulifera</i> NA COSTA NORDESTE DO ATLÂNTICO SUL, BRASIL	
Introdução.....	95
Materiais e métodos.....	97
Resultados.....	101
Discussão.....	111
Referências.....	117
CAPÍTULO 5	123
UTILIZAÇÃO DE <i>Littoraria angulifera</i> (GASTROPODA) COMO ORGANISMO-TESTE PARA A CONTAMINAÇÃO PELO ORGANOESTÂNICO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT)	
Introdução.....	126
Materiais e métodos.....	128
Resultados.....	134
Discussão.....	139
Referências.....	144
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	148
APÊNDICES.....	151
ANEXOS.....	154

INTRODUÇÃO

Os moluscos são recursos alimentares em todo o mundo. Eles apresentam uma rica composição nutricional e servem de fonte econômica, alimentícia e de subsistência para muitas comunidades litorâneas. No Brasil, seu consumo tem aumentado nos últimos anos e conseqüentemente, a aquicultura tem acompanhando esse crescimento. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food of Agriculture Organization of the United Nations*= FAO), até 2025, o Brasil vai liderar esse setor nas Américas, superando países como o Chile (FAO, 2016).

Nos últimos anos, a Bahia vem se estabelecendo como um estado produtor de ostras, onde os cultivos têm sido fonte de recurso para as comunidades ribeirinhas, que vêm se beneficiando com a venda dos produtos cultivados, bem como com o extrativismo (Luz e Be oehs, 2016).

O litoral da Bahia possui mais de 1.100 km de extensão, sendo a costa mais extensa dentre os estados brasileiros. Ao longo dessa área, podem ser encontrados vários ecossistemas da Zona Costeira, como praias, restingas, lagunas e manguezais. O clima é quente e úmido, com temperatura média anual de 25°C e com pluviosidade de 2.400 a 2.500 mm ao ano (CRA, 1995). Segundo política e gestão da Secretaria de Planejamento do Governo da Bahia (SEPLAN), o estado está dividido em 27 Territórios de Identidade, além de possuir várias Unidades de Conservação (UCs), seja de proteção integral ou uso sustentável. O Litoral Sul é formado por 26 municípios, entre os quais estão Canavieiras, Ilhéus, Itacaré e Maraú e nessa região está inserida a Reserva Extrativista (RESEX) de Canavieiras. No Baixo Sul, estão inseridos 15 municípios, entre eles, Valença, Taperoá e Camamu e nesse território localiza-se a Área de Proteção Ambiental (APA) da Baía de Camamu, com 118.000 ha (SEPLAN, 2016).

A atividade pesqueira e extrativista é a principal fonte de renda para muitas famílias do litoral da Bahia. Cultivos de ostras são praticados no trecho mais ao norte do Litoral Sul, nos municípios de Taperoá, Camamu e Maraú, com o apoio de instituições públicas e fomento dos governos federal e estadual. Como

os moluscos são organismos filtradores, a sanidade do ambiente nos quais são extraídos ou cultivados é imprescindível, uma vez que estes acumulam poluentes provenientes do local em que estejam. Dessa forma, a avaliação e o monitoramento ambiental em áreas de cultivo, extrativismo e pesca são imprescindíveis, do ponto de vista ecológico e sanitário (LUZ e BOEHS, 2016).

Os estuários são considerados ambientes altamente complexos e dinâmicos e são influenciados por uma variedade de estressores naturais e antropogênicos, que podem afetar a saúde e a estabilidade desses ecossistemas (O'CONNOR, 1996; TELESH, 2004). Áreas com grande fluxo de embarcações, como portos, marinas, atracadouros e estaleiros, estão geralmente situadas em regiões estuarinas e são mais susceptíveis à contaminação ambiental. Dentre os contaminantes orgânicos danosos aos ecossistemas marinhos, os biocidas à base de organoestânicos (COEs), como o TBT (tributilestanho) e o TPT (trifenilestanho), usados como princípio ativo de tintas anti-incrustantes em embarcações, têm sido motivo de preocupação nas últimas décadas, devido à sua alta toxicidade (READMAN, 2006). Os COEs têm alta toxicidade no meio aquático. Por possuírem características hidrofóbicas, uma vez na coluna d'água, concentram-se na matriz sedimentar e biológica, o que torna os ambientes estuarinos favoráveis para o monitoramento (MAGUIRE, 1996; ANTIZAR-LADISLAO, 2008).

Espécies que respondem a estressores antropogênicos por meio de reações e/ou alterações genéticas, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, ecológicas ou comportamentais que indicam ou refletem a qualidade do ambiente, são chamadas de bioindicadoras (MCCARTY; MUNKITTRICK, 1996). Moluscos gastrópodes apresentam grande potencial de bioacumulação de COEs e habilidade limitada para metabolizar e eliminar tais compostos, sendo considerados excelentes bioindicadores da poluição por TBT nos ecossistemas marinhos (TITLEY-O'NEAL et al., 2011).

Atualmente faz-se uso de mais de 260 moluscos no monitoramento biológico de contaminação por COEs em todo o mundo (TITLEY-O'NEAL et al., 2011). Esses compostos causam disrupção endócrina nos gastrópodes, levando a

sobreposição de caracteres masculinos em fêmeas de neogastrópodes, alteração denominada de *Imposex* (ALZIEU, 1986). Em altas concentrações em *Littorina littorea* (L.), foi observada a substituição gradual do oviduto por uma próstata, o desenvolvimento de um pênis similar ao dos machos e de um ducto espermático, alteração que foi chamada de *Intersex* (BAUER et al., 1995).

No Brasil, o gastrópode *Stramonita rustica* (Lamarck, 1822) (Neogastropoda: Muricidae) tem sido amplamente utilizado para fins de monitoramento de áreas contaminadas por organoestânicos em ambientes costeiros. No Nordeste, por ser mais abundante, é uma das espécies mais apropriadas para esse fim (CASTRO et al., 2007). No entanto, em alguns desses ambientes costeiros, não há a presença de neogastrópodes ou existe em número reduzido para amostragem, como é o caso dos estuários. Desse modo, no Brasil, biomonitoramentos relacionados a contaminação pelo TBT em áreas estuarinas são praticamente inexistentes, por não existirem organismos sentinela definidos para tal contaminação.

Algumas espécies mostram uma associação obrigatória com os estuários (PLAZIAT et al., 2001), exibindo um conjunto específico de adaptações para a vida nesses locais (VERMEIJ, 1973; REID, 1992) e este é o caso da *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) (Mesogastropoda: Littorinidae). Por se tratar de uma espécie conspícua nos ambientes de manguezais, detritívora e microfágica, sendo elo entre os produtores primários e consumidores, cuja biologia, fisiologia e ecologia são bem conhecidas (MARCUS; MARCUS, 1963; REID, 1999), possuir baixo índice de sazonalidade, ser facilmente manipulável em laboratório e obedecer aos critérios de seleção para organismos-teste para contaminação ambiental (RAND; PETROCELLI, 1985). Os mesogastrópodes são alternativas para locais onde não há neogastrópodes, como nos manguezais. Por isso, podem ser testados para avaliação da contaminação por COEs em ambientes estuarinos, seja através de ensaios ecotoxicológicos (como indicadores ativos) ou no ambiente (como indicadores passivos).

O litoral sul da Bahia apresenta uma extensa área estuarina, com potencial para malacocultura e onde a atividade pesqueira é a principal fonte de renda para

muitas famílias ribeirinhas, que retiram do manguezal e das áreas localizadas no entorno do estuário a maior parte do seu sustento (LUZ e BOEHS, 2016). Nesta região, existem ainda diversas atividades náuticas, como marinas de embarcações de pequeno e médio porte ao longo de todo esse trecho, um estaleiro naval na Baía de Camamu e o Porto de Ilhéus. Apesar de um extenso monitoramento da contaminação por COEs ter sido realizado no Nordeste e na região norte do estado da Bahia, existe uma lacuna de informações a respeito desse tipo de contaminação na região sul do estado (Figura 1).



Figura 1. Áreas avaliadas por *Imposex* em gastrópodes (∇) e contaminação por organoestânicos em sedimentos (—) e mamíferos marinhos (▲) da costa sul-americana (Fonte: CASTRO et al., 2012)

Para identificar a utilização das tintas anti incrustante (AI) a base de COEs no Litoral Sul da Bahia, este estudo foi realizado nessa região, a fim de avaliar a contaminação por COEs em áreas potenciais, como portos, estaleiros, marinas e locais de pesca, utilizando o neogastrópode *Stramonita rustica* (Apêndice I), já amplamente usado e validado como bioindicador para este tipo de contaminação na costa do Brasil e adicionalmente, propor um novo protocolo para avaliação da contaminação por COEs em ambientes estuarinos, utilizando o mesogastrópode *L. angulifera*, através da observação do aparelho reprodutivo das fêmeas *in situ*, análise química dos sedimentos e pela validação desta técnica através de experimentos laboratoriais.

Esta tese de doutoramento foi fundamentada nos conceito de Ecotoxicologia, definida por Truhaut (1975) como o ramo da Toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais, sobre os organismos vivos que constituem a Biosfera. Desde então, essa ciência se desenvolveu como uma disciplina científica própria, descrevendo não só os efeitos da exposição a produtos químicos e à radiação, mas também o futuro ambiental dos contaminantes (HARTL, 2002).

Para efeitos de apresentação da tese, foi feita inicialmente uma ampla revisão bibliográfica sobre o tema, que aborda os principais aspectos conceituais que serão apresentados ao longo do trabalho. Posteriormente, o estudo foi dividido em três temas centrais: a avaliação da contaminação pelo organoestânico TBT em ambientes costeiros; a biologia populacional e biometria do aparelho reprodutivo do caenogastrópode *L. angulifera* e o ensaio de toxicidade utilizando diferentes concentrações de TBT nessa espécie em conjunto com a comparação com os dados de campo.

Para sistematização dos dados e organização temática, a tese foi subdividida em cinco capítulos, da seguinte maneira:

Capítulo 1 - PANORAMA DA CONTAMINAÇÃO E DO MONITORAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO (COES): HISTÓRICO E PERSPECTIVAS DE AVALIAÇÃO

Nesse capítulo teve-se por objetivo revisar as informações disponíveis na literatura sobre tintas anti-incrustantes a base de COEs, seus efeitos nos organismos não alvo, assim como gerar um panorama dos monitoramentos ecotoxicológicos na América Latina e no mundo, bem como sobre as novas perspectivas dessa atividade.

Capítulo 2- AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR TRIBUTILESTANHO BASEADA EM IMPOSEX EM *Stramonita rustica* (MOLLUSCA: GASTROPODA) AO LONGO DA COSTA SUL DA BAHIA, NORDESTE DO BRASIL

Nesse capítulo, foi avaliada a contaminação pelo organoestânico TBT no Litoral Sul da Bahia (Canavieiras, Ilhéus, Itacaré e Marau), utilizando o neogastrópode *S. rustica*, com o fim de verificar a presença do contaminante nessa região.

Capítulo 3 - EFICIÊNCIA DE ANESTÉSICOS SOBRE O GASTRÓPODE *Littoraria angulifera*

Nesse capítulo, realizou-se um experimento utilizando os anestésicos Cloreto de Magnésio, Mentol e Eugenol, cada um em três diferentes concentrações, com o objetivo de verificar qual anestésico/concentração é mais eficiente para estudos com o gastrópode *L. angulifera*. A finalidade direta deste experimento foi aplicar o melhor resultado nos indivíduos submetidos ao experimento ecotoxicológico realizado no Capítulo 5.

Capítulo 4 - MORFOLOGIA, RECRUTAMENTO E COMPORTAMENTO DE *Littoraria angulifera* NA COSTA NORDESTE DO ATLÂNTICO SUL, BRASIL

Esse capítulo aborda os dois temas centrais: (1) a avaliação do tamanho da concha de *L. angulifera* ao longo do litoral sul da Bahia, em regiões antropizadas e pouco antropizadas, bem como (2) os principais aspectos morfológicos,

reprodutivos e comportamentais de *L. angulifera* em um manguezal controle, de baixa antropização.

Capítulo 5 - UTILIZAÇÃO DE *Littoraria angulifera* (GASTROPODA) COMO ORGANISMO-TESTE PARA A CONTAMINAÇÃO PELO ORGANOESTÂNICO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT)

Esse capítulo teve como objetivo verificar, através de dois ensaios ecotoxicológicos, os efeitos causados pelo TBT nos órgãos reprodutivos de *L. angulifera* em diferentes concentrações e classes de tamanho, comparar os resultados obtidos nos ensaios com os dados da matriz ambiental e propor um novo protocolo de monitoramento em ambientes estuarinos para este contaminante.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a contaminação por Tributil-estanho (TBT) via *Imposex* no neogastrópode *Stramonita rustica* e analisar as alterações causadas por este no aparelho reprodutivo no mesogastrópode *Littoraria angulifera*, *in situ* e experimentalmente, com vistas à indicação desta espécie como nova bioindicadora desse composto em ambientes estuarinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma ampla revisão sobre o uso de compostos orgânicos de estanho, implicações de uso e seus principais bioindicadores; (Capítulo 1)
- Verificar a ocorrência da alteração sexual do tipo *Imposex* no gastrópode *Stramonita rustica* na costa sul do estado da Bahia; (Capítulo 2)
- Analisar a biometria (altura da concha) do gastrópode *Littoraria angulifera* de ambientes com diferentes níveis de antropização na costa sul da Bahia; (Capítulo 3)
- Caracterizar aspectos reprodutivos e comportamentais de *L. angulifera* na região; (Capítulo 3)
- Descrever a morfologia de *L. angulifera* na região; (Capítulo 3)

- Analisar a morfometria do aparelho reprodutor de *L. angulifera*, com vistas ao uso da espécie como biomonitora de contaminação por Tributílo-estanho (TBT); (Capítulo 3)
- Testar o melhor anestésico para uso em manipulação e estudos laboratoriais de *L. angulifera*; (Capítulo 4)
- Detectar experimentalmente alterações morfológicas sexuais em *L. angulifera* sob diferentes concentrações de Tributílo-estanho (TBT); (Capítulo 5)
- Comparar os resultados dos testes de TBT sobre *L. angulifera* com os obtidos em locais com contaminação por esse composto; (Capítulo 5)
- Comparar a eficácia do uso dos testes via alimentação e via injeções pelo TBT em *L. angulifera*; (Capítulo 5)
- Indicar, em *L. angulifera*, os parâmetros morfométricos sexuais mais adequados para uso dessa espécie como bioindicadora de TBT em estuários. (Capítulo 5)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZIEU, C. Biological effects of tributyltin on marine organisms. In: **Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant**. DE MORA, S. J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 167-209.

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

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

CASTRO, I. B.; LIMA, A. F. A.; BRAGA, A. R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. A. *Imposex* in two muricid species (Mollusca: Gastropoda) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 81-91, 2007.

Conselho Regional de Administração da Bahia – CRA. **Publicações**, Bahia, 1995. Salvador (BA).

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. **Partnering to achieve resilience and food and nutrition security**. n. AX274, p. 2. 2016.

HARTL, M. G. J. Benthic Fish as Sentinel Organisms of Estuarine Sediment Toxicity. In: **The Vienna School of Marine Biology: A Tribute to Jörg Ott Bright**. DWORSCHAK, M., P.C.; STACHOWITSCH, M. (eds.). Facultas Universitätsverlag, Wien, 2002. p. 89-100.

MAGUIRE, R. J. The occurrence, fate and toxicity of tributyltin and its degradation products in fresh water environments. In: **Tributyltin: case study of an environmental contaminant**. DE MORA S. J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 94-138.

MARCUS, E.; MARCUS, E. Mesogastropoden von der Küste São Paulos. **Akademie der Wissenschaften: Abhandlungen der math.-naturw. Klasse**, v. 1, p. 1-105. 1963.

MCCARTY; L.S.; MUNKITTRICK, K.R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? **Human Ecology Risk Assessment** v. 2, p. 268-74. 1996.

O'CONNOR, R.J. Toward the incorporation of spatiotemporal dynamics into ecotoxicology. In: **Population dynamics in ecological space and time**.

PLAZIAT, J. C.; CAVAGNETTO, C.; KOENIGUER, J. C.; BALTZER, F. History and biogeography of the mangrove ecosystem, based on a critical reassessment of the paleontological record. **Wetlands Ecology and Management**, v. 9, p. 161-179, 2009.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (eds.). Hemisphere Publishing Corporation, New York, NY. 1985, p. 662.

READMAN, J. W. Development, occurrence and regulation of antifouling paint biocides: historical review and future trends. In: **Antifouling paint biocides**. I. KONSTANTINOU (ed.). Springer, Berlin Heidelberg, Germany, 2006. p. 1-16.

REID, D.G. Predation by crabs on *Littoraria* species (Littorinidae) in a Queensland mangrove forest. In: **Proceedings of the 3rd International Symposium on Littorinid Biology**. GRAHAME, J. P. J.; MILL, P. J.; REID, D. G. (eds.). Malacological Society of London, London. 1992. p. 141-151.

REID, D.G. The genus *Littoraria* Griffith & Pidgeon, 1834 (Gastropoda: Littorinidae) in the tropical eastern Pacific. **Veliger**. v. 42, p. 21-53. 1999.

RHODES, O.E.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. (eds.). University of Chicago Press, Chicago, 1996, p. 281-317.

SEPLAN. Secretaria do Planejamento. Bahia 2016. Salvador (BA).

TELESH, I. V. Plankton of the Baltic estuarine ecosystems with emphasis on Neva Estuary: a review of present knowledge and research perspectives. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, p. 206-219. 2004.

TITLEY-O'NEAL, C. P.; MUNKITTRICK, K. R.; MACDONALD, B. A. The effects of organotin on female gastropods. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 13, p. 2360-2388. 2011.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology - A New Branch of Toxicology: A General Survey of its Aims Methods, and Prospects. In: **Ecological Toxicology**. A.D. McINTYRE; C.F. MILLS (eds). Springer, New York, US, 1975. p. 3-23.

VERMEIJ, G. J. Molluscs in mangrove swamps: physiognomy, diversity, and regional differences. **Systematic Zoology**, v. 22, p. 609-624. 1973.

CAPÍTULO 1

PANORAMA DA CONTAMINAÇÃO E DO MONITORAMENTO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ESTANHO (COEs): HISTÓRICO E PERSPECTIVAS DE AVALIAÇÃO

1- Poluição e contaminação por tintas *antifouling* à base de compostos orgânicos de estanho (COEs)

Os termos poluição e contaminação são conceitos relacionados à degradação da qualidade ambiental e se distinguem, em ecotoxicologia, pelo fato de a primeira provocar danos direta ou indiretamente aos recursos naturais ou risco para a saúde humana (CLARK, 1992). Porém, nem toda alteração ecológica pode ser considerada poluição. De acordo com Chapman (1995), a contaminação é definida como a presença e aumento artificial acima do permitido de uma determinada substância ou patógeno no ambiente, no entanto, se não resultar em uma alteração das relações ecológicas, esta não é considerada uma forma de poluição. Dessa maneira, um poluente sempre é um contaminante, mas nem todos contaminantes são poluentes (CHAPMAN, 2001).

Existem vários grupos de compostos químicos que apresentam potencial poluente para o ambiente aquático, dentre os quais estão os biocidas de matriz orgânica utilizados como princípios ativos de tintas anti-incrustantes (AI), que têm sido motivo de preocupação nas últimas décadas (READMAN, 2006). Em geral, tintas AI incorporam em sua composição biocidas que evitam que organismos formadores das comunidades incrustantes (*fouling*) se estabeleçam sobre a superfície revestida (ALMEIDA et al., 2007). Esses biocidas, por sua vez, são liberados das pinturas, provocando danos aos ecossistemas aquáticos, principalmente nas regiões onde se observa um grande fluxo de embarcações (READMAN, 2006) como áreas costeiras sob influência de portos, marinas e estaleiros (SONAK et al., 2009). Entretanto, sem essas tintas, os processos de corrosão seriam acelerados, assim como as atividades de docagem teriam que ser realizadas com maior frequência, o que tornaria essa atividade economicamente inviável devido ao aumento dos custos (KOTRIKLA, 2009).

Os primeiros registros da utilização de tintas AI datam da metade do século XIX (YEBRA et al., 2004), quando eram usados o óxido de cobre e/ou de zinco como agentes biocidas e que são atualmente conhecidos como AI de primeira

geração (FERNANDEZ & PINHEIRO, 2007). No início da década de 1960, uma segunda geração de tintas AI passou a ser utilizada, tendo como base compostos orgânicos de estanho (COEs), como o TBT (tributil-estanho) e o TPhT (trifenil-estanho), que mostraram ter uma durabilidade muito superior quando comparada às anteriores (FENT, 2003).

Os COEs têm alta toxicidade no meio aquático. Devido à sua baixa solubilidade na água, estes podem ser incorporados pelos organismos aquáticos e assim causarem diversos efeitos em diferentes táxons e/ou serem depositados no sedimento superficial, onde podem permanecer por longos períodos devido a seu lento processo de degradação (MAGUIRE, 1996; ANTIZAR-LADISLAO, 2008). O destino e as consequências ecotoxicológicas dos COEs nos ecossistemas aquáticos dependem diretamente da persistência e dos mecanismos de degradação desses compostos (MAGUIRE, 1996). É possível afirmar que o TBT é a substância mais tóxica já produzida pelo homem e deliberadamente introduzida no meio ambiente (GOLDBERG, 1986; STEWART et al., 1992). Desta maneira, os COEs são, definitivamente, contaminantes dos ambientes marinhos e estuarinos e, devido aos seus efeitos adversos sobre os recursos naturais, são considerados também poluentes.

2- Compostos orgânicos de estanho e seu histórico de utilização

Os COEs pertencem a uma classe de poluentes organometálicos. Sua estrutura é formada por uma parte de um composto orgânico de estanho, combinado a três cadeias de n-butyl-covalente, ligadas a um único átomo de estanho (Sn-C ligações covalentes) e a outro grupo funcional como cloreto, óxido ou hidróxido, representado por metil, butil, octil e fenilestanho (HOCH, 2001). Os compostos orgânicos de estanho são mostrados na Figura 1.

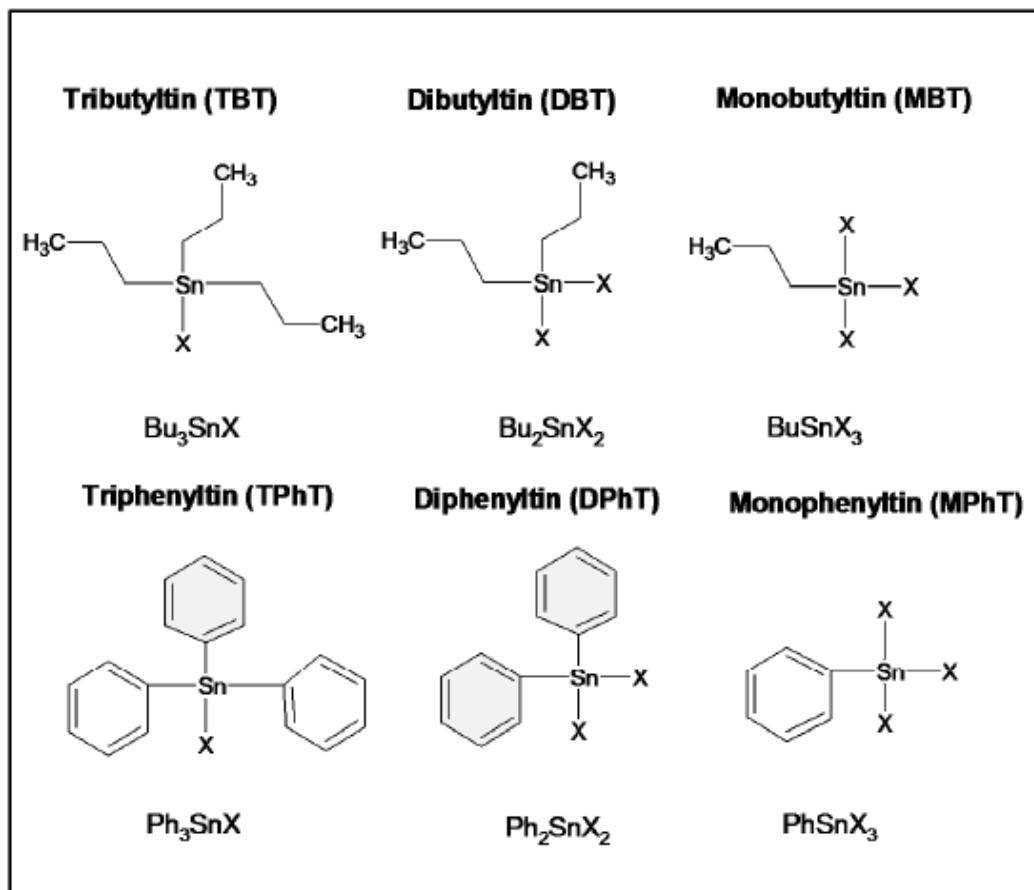


Figura 1. Compostos orgânicos de estanho. O X indica o anel covalente, como cloreto, óxido e hidróxido (Fonte: SANTOS et al., 2011).

Os COEs são conhecidos desde 1853 e o seu primeiro registro de aplicação prática ocorreu em 1925, quando ainda eram chamados de agentes anti-trações. Mas foi na década de 1940 que ganharam importância para a indústria e passaram a ter suas propriedades largamente exploradas comercialmente (LUITJEN, 1987 *apud* GODOI et al., 2003). Desde então, estes têm sido largamente utilizados em diversos setores industriais, como iluminação, estabilização do cloreto de polivinila (PVC) e proteção para madeiras, mas ganharam maior notoriedade no final da década de 1960, quando começaram a ser utilizados como biocidas em tintas AI. Desde então, têm sido intensivamente aplicados em cascos de navios, estruturas portuárias, plataformas marinhas e até em estruturas de aquicultura (GARAVENTA et al., 2006; CHOI et al., 2009; DÍEZ & BAYONA, 2009). Os dois principais COEs utilizados em tintas AI são o TBT e o TPhT (Figura 1). A utilização desses compostos como agentes biocidas

nas tintas AI constitui-se na principal fonte de contaminação para o ambiente aquático até a presente data (DE MORA, 1996; YEBRA et al., 2004).

Segundo a Organização Marítima Internacional (IMO, 1999), a bioincrustação (acúmulo indesejável de organismos marinhos em superfícies sólidas submersas na água do mar) leva a um aumento dramático da resistência à água e, por conseguinte, a um aumento do consumo de combustível de 40 a 50%, o que decorre em função da maior demanda de potência requerido dos motores das embarcações. Várias substâncias, tais como o arsênico, o organomercúrio e os organocloreto, foram usadas para controlar organismos incrustantes. Entretanto, todas apresentam efeitos ambientais inaceitáveis, sendo que a maioria das mesmas provoca extinção local ou regional de invertebrados (GIBBS et al., 1991; STEWART et al., 1992).

No final da década de 1960, as tintas AI de segunda geração, à base de compostos orgânicos de estanho (COE) como o TBT e o TPhT, encontraram seu nicho no mercado, pois apresentavam características economicamente importantes, como durabilidade muito superior quando comparada aos produtos das gerações anteriores, assim como estabilidade ambiental e baixa solubilidade na água (FENT, 2003). Estima-se que no final da década de 1980, 70 a 80% da frota mundial de navios mercantes utilizavam esses compostos em seus cascos para prevenir a bioincrustação (LUDGATE, 1987; CHAMP, 2003).

Entretanto, as mesmas características que tornaram o TBT economicamente importante para o mercado, foram exatamente as que tornaram prejudicial ao ambiente. Em apenas uma década, uma série de problemas relacionados à sua elevada toxicidade ambiental começaram a surgir. Relatos associaram o seu uso com a descrição de malformações da concha e falha reprodutiva em ostras, assim como a anormalidades sexuais e diminuição da abundância de gastrópodes em ecossistemas costeiros (ALZIEU et al., 1981).

No final da década de 1970, houve um declínio severo na produção de ostras na Baía de Arcachon (França) devido a um processo conhecido como "o engrossamento das conchas" ou "chambering". Para além dessa malformação nas conchas, o TBT também foi associado à queda na produção de juvenis e à

sobrevivência das ostras, levando ao declínio da produção naquela região (ALZIEU, 1986). O espessamento das conchas, descrito pela primeira vez nesse país, foi registrado posteriormente no Reino Unido e alguns anos mais tarde na Austrália e na Nova Zelândia (DE MORA, 1996), tendo sido a causa da primeira medida legislativa em nível mundial, que proibiu, em 1982, a aplicação de tintas AI à base de TBT.

Esses problemas levaram a IMO (Organização Marítima Internacional) a propor o banimento mundial dessas tintas em 2003, mas, tal proibição somente entrou em vigor cinco anos mais tarde (ALMEIDA et al., 2007). Em resposta à demanda causada pela regulamentação imposta às tintas à base de TBT, a indústria naval lançou no mercado uma terceira geração de tintas anti-incrustantes. Essas tintas utilizam compostos metálicos e orgânicos de forma concomitante a fim de maximizar a sua atividade biocida (ALMEIDA et al., 2007). A utilização desses novos produtos foi homologada pela IMO após a proposição do banimento mundial do TBT (OKAMURA & MIENO, 2006). Os principais compostos (alguns indicados com o nome comercial) atualmente usados em tintas anti-incrustantes são: Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine, Clorotalonil, Diclofluanida, Tiram, Busan (TCMTB), TCMS Piridina, Trifenilbornano Piridina, Zinco Piritona, Cobre Piritona, Ziram, Maneb, Óxido Cuproso, Tiocianato de Cobre e Naftenato de Cobre (YEBRA et al., 2004).

3- Legislação mundial e regulamentação do uso de tintas à base de COEs na América Latina e no Brasil

O primeiro governo a proibir o uso de tintas AI à base de COEs foi o francês, após o colapso da indústria de ostras na baía de Arcachon no início dos anos 80 (ALZIEU et al., 1986; ALZIEU, 2000). A medida proibiu o uso dessas tintas com mais de 3% de TBT nos navios maiores que 25 m de comprimento. Esse regulamento foi então estendido para toda a costa da França, com exceção de estruturas de alumínio, pois estas sofreriam corrosão severa quando protegidas apenas com preparações de cobre (STEWART, 1996). Ainda na França, a proibição do uso de tintas AI com COEs foi estendida ao público em geral em

outubro de 1992 e a partir de então esses compostos só estavam disponíveis em embalagens especiais para estaleiros (ALZIEU, 1996). No final dos anos 80 e início da década de 1990, foram introduzidas legislações semelhantes no Reino Unido, Estados Unidos da América, Austrália, Canadá, Holanda, Japão, Dinamarca, China e Hong Kong (CHAMP, 2000). Por sua vez, a Áustria e a Suíça, países que não têm acesso direto ao mar, proibiram o TBT nos seus lagos e rios, para minimizar os efeitos diretos nas comunidades de organismos de água doce e os impactos indiretos sobre os habitats marinhos a jusante (BECKER VAN-SLOOTEN & TARRADELLAS, 1994; FENT, 1996).

Posteriormente, restrições semelhantes foram introduzidas na maioria dos países mais industrializados, especificamente: no Reino Unido, em 1987; nos Estados Unidos e na Nova Zelândia em 1988; e no Canadá, Austrália, Noruega e Japão, em 1989/90 (IMO, 2002). Nesses países, também tornou-se obrigatório registrar todos os produtos à base de TBT como, por exemplo, os pesticidas (STEWART, 1996). Essas medidas levaram, em alguns locais, a um declínio da poluição por TBT na água, no sedimento e nos tecidos dos moluscos, acompanhado pela recuperação do crescimento normal das conchas de ostras e pela diminuição da intensidade de alterações sexuais em gastrópodes (GIBBS & BRYAN, 1994). Ainda que vários países já tivessem restringido o seu uso, era óbvio que medidas internacionais teriam que ser adotadas.

Com a preocupação com a poluição ambiental causada por tintas AI à base de COEs, assunto inicialmente levantado pelo Comitê de Proteção do Meio Marinho da IMO (MEPC) na Comissão de Paris em 1988, foi solicitado à esta considerar a necessidade da criação de instrumentos legais amplos e relevantes para restringir o uso de COEs nos navios (IMO, 2002). Por razões econômicas, o MEPC concluiu que não era viável abolir drasticamente o uso de sistemas AI com COEs em grandes navios mercantes (CHAMP, 1999). Entretanto, a partir das descrições de estudos sobre os efeitos biológicos do TBT nos ecossistemas marinhos, houve evidências claras de que esses compostos eram extremamente nocivos aos organismos aquáticos. Foi então, que em 1º. de janeiro de 2003, o MEPC aprovou um projeto de resolução proibindo novas aplicações de tintas AI

à base de COEs nos cascos dos navios (proibição total) até 1º. de janeiro de 2008 (IMO, 2008).

No que tange a legislação referente a tintas AI à base de COEs na América Latina, a Prefeitura Naval da Argentina (órgão responsável pelo transporte marítimo naquele país) proibiu o uso de tintas AI à base de TBT em todos os navios em 1998 (Resolução 04/98) e embora essa resolução também regule procedimentos relativos à substituição de revestimentos (DPMA, 1998), tintas à base de TBT ainda são comercializados naquele país (BIGATTI et al., 2009). No Chile, o Instituto Nacional de Normalização regula apenas os valores de estanho metálico (Sn0) na água (INN, 2001), sendo que o limite permitido em áreas de proteção costeira é de 0,5 mg L⁻¹ (CASTRO et al., 2012).

No Brasil, a Marinha do Brasil suspendeu, em 2003, o uso de tintas anti-incrustantes à base de TBT nos seus navios e promulgou, em 2007, a regulação NORMAN 23, que restringe o uso de COEs em tintas AI. Apesar do banimento, os níveis de COEs em alguns compartimentos ambientais continuam não definidos nas leis brasileiras. A única regulamentação que trata sobre a utilização de COEs no Brasil é a resolução CONAMA de número 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), a qual estabelece as concentrações máximas de TBT apenas na água. Os níveis permitidos e o uso determinado variam de acordo com a categoria de água (doce, salobra ou água do mar). Níveis de até 10 e 370 ng L⁻¹ são tolerados para as classes 1 e 2, respectivamente, de águas salobras e marinhas. Entretanto, como mencionado acima, devido ao seu comportamento hidrofóbico, esses contaminantes associam-se ao sedimento e aos organismos aquáticos. Dessa forma, a estimativa utilizando apenas os níveis de COEs na coluna d'água pode subestimar as concentrações reais no ambiente e os riscos à biota.

Outro problema relacionado com o monitoramento de COEs no Brasil são os recursos financeiros e o tempo para as análises. Segundo Dos Santos et al. (2011), um programa de manejo institucional e o desenvolvimento de novas tecnologias, que visem uma rápida e precisa quantificação destes compostos,

devem ser discutidos pelos órgãos ambientais do Brasil, a fim de que estes criem leis que tenham efeito sobre o controle e a remediação dos COEs.

4- Distribuição dos COEs nos sistemas aquáticos e estratégias de monitoramento

Devido à sua ampla utilização em sistemas de tintas AI nas últimas décadas, os produtos resultantes da degradação de COEs, especificamente do TBT, são geralmente encontrados em canais de transporte aquícola de suas regiões subsequentes, como portos, estaleiros, marinas e docas. Nestes últimos, como são feitos reparos e pinturas nos barcos, os riscos para os sistemas aquáticos são ainda maiores (GIPPERT, 2009). Em função da maioria dos portos e marinas estarem instalados em regiões estuarinas, os COEs são frequentemente encontrados em altas concentrações nestes sistemas. Conforme Godoi et al. (2003), os sedimentos dos estuários, por terem uma grande quantidade de matéria orgânica, são favoráveis para a adsorção desses contaminantes.

Uma vez introduzidos no meio aquático, os COEs podem se tornar disponíveis através de processos físicos (ressuspensão por dragagem e ação de correntes e de marés) e biológicos (bioperturbações). A hidrofobicidade, processo de partição termodinamicamente regido entre a água e a fase lipídica do organismo, é considerado o principal parâmetro na bioconcentração desses compostos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Essa degradação envolve a remoção sequencial dos grupos butil, por desalquilação, conduzindo à formação de dibutilestanho (DBT), monobutilestanho (MBT), estanho e finalmente do estanho inorgânico Sn^{4+} . Devido a essa característica, os níveis de COEs na água são geralmente mais baixos quando comparados aos níveis nos sedimentos e nos organismos (PINOCHET et al., 2009).

Essas propriedades devem ser levadas em consideração para criar estratégias de monitoramento. Por exemplo, para amostragens utilizando água, a variação de COEs pode ser alta e os resultados podem representar a contaminação apenas naquele momento. Por isso, as matrizes biológicas e de sedimento são as

melhores para realizar o monitoramento desses compostos, e entre estas, as primeiras são o melhor parâmetro devido aos vieses que podem ser causados nas amostras de sedimentos, já que algumas áreas de amostragem podem ser mais suscetíveis ao processo de degradação, como por exemplo, as regiões do mediolitoral em relação às regiões do sublitoral (SANTOS et al., 2011).

5- Efeitos tóxicos dos COESs sobre organismos não alvo

As consequências toxicológicas dos COEs começaram a ser vistas uma década após o início da sua utilização, como descrito acima o caso do declínio da produção de ostras na baía de Arcachon, na França (ALZIEU et al., 1986). Nesse mesmo período, estudos ligaram o TBT à disrupção endócrina e ao declínio da população de gastrópodes naquela região (BRYAN et al., 1986, 1987).

Ao lado das deformidades em gastrópodes (GIBBS et al., 1987; BAUER et al., 1995), os efeitos tóxicos dos COEs afetam diversos níveis de organização biológica dentro do ecossistema (RUIZ et al., 1998) e, dessa forma, estas podem atingir o ser humano, uma vez que o consumo de mariscos é parte da dieta de muitas pessoas em todo o mundo (CHIEN et al., 2002). A Tabela 1 mostra o efeito causado em diversos organismos por diferentes níveis de concentração do TBT.

Tabela 1. Efeitos tóxicos causados a diversos organismos aquáticos submetidos a diferentes concentrações de TBT

Concentração de TBT	Organismo	Efeitos	Referência
>1 ngL ⁻¹	Fitoplâncton e zooplâncton	Limitação da divisão celular e da reprodução	Petersen & Gustavson, 1998 Sidharthan et al., 2002
>2 ngL ⁻¹	Moluscos	Crescimento anormal da concha; Esterilização das fêmeas (<i>Imposex/Intersex</i>); Mortalidade;	Alzieu et al., 1981 Smith, 1971 Bryan et al., 1986 Bauer et al., 1995

		Danos no DNA	Page et al., 1996
		Má formação embrionária	Matthiessen & Gibbs,
		Alteração da estrutura da comunidade	1998 Gabbianelli et al., 2006 Rank, 2009
1-10 mgL ⁻¹	Peixes	Afecção da reprodução Inibição do crescimento; Masculinização das fêmeas; Anomalias espermáticas; Redução da fecundidade	Fent, 1996; McAllister & Kime, 2003; Shimasaki et al., 2003
500 mgL ⁻¹	Crustáceos	Distúrbios no processo de muda Diminuição da taxa de crescimento dos juvenis	Takeuchi et al., 2001 Aono & Takeuchi, 2008
1-1000 mgL ⁻¹	Mamíferos	Mudanças comportamentais em ratos; Efeitos citotóxicos em baleias e golfinhos Indução a obesidade Inibição da atividade basal da ATPase e calmodulina-dependente de Ca ²⁺ nas membranas sinápticas de cérebro de ratos;	Fent, 1996; Choi et al., 2011 Grün et al., 2006 Wang et al., 2006 Singh et al., 1979

Em conjunto com os efeitos acima listados, a principal consequência dos COEs sobre o ambiente marinho é a sua ação como desregulador endócrino. Dentre os organismos não alvo, os moluscos são um dos grupos mais sensíveis ao TBT e dessa forma, estes são excelentes organismos sentinelas para monitorar a sua presença em ambientes marinhos (SHIM et al., 2002). Nesses organismos,

o TBT e o TPhT causam *Imposex*, *Intersex* e *ovotestis*, resultando em falência reprodutiva em gastrópodes (OEHLMANN et al., 1998).

O *Imposex* é definido como a sobreposição de caracteres sexuais masculinos, tais como o pênis e canais deferentes em fêmeas de neogastrópodes expostos a COEs (GIBBS & BRYAN, 1987). Essa resposta biológica é considerada a mais sensível a este contaminante, ocorrendo em concentrações abaixo de 1ng St.g^{-1} de TBT (AXIAK et al., 1995) e por esse motivo, o *Imposex* pode ser usado como biomarcador para diferentes níveis de contaminação (SMITH, 1996). Diversas teorias têm tentado explicar os mecanismos pelo qual os COEs causam essas perturbações endócrino/metabólicas e induzem ao *Imposex* em gastrópodes, mas, até o momento, a mais aceita é a ativação do receptor do retinóide X (RXR) (NISHIKAWA et al., 2004; HORIGUHSI et al., 2007, 2008, 2012; STERNBERG et al., 2008).

Outra síndrome causada pelos COEs é chamada de *Intersex* e afeta principalmente gastrópodes da Ordem Mesogastropoda. É descrita como uma transformação gradual do oviduto palial das fêmeas em caracteres reprodutivos masculinos (BAUER et al., 1995). Essa síndrome foi primeiramente observada em *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) e descrita por BAUER et al. (1995).

A terceira síndrome causada pela contaminação por COEs é conhecida como *ovotestis* e foi observada em *Haliotis madaka* Habe, 1977 (Archaeogastropoda) por Horiguchi et al. (2000). Nessa síndrome, ocorre a masculinização do ovário, onde o tecido da gônada da fêmea desenvolve tecido testicular. Esses autores sugeriram que esse fenômeno é similar ao *Imposex*, embora nesse caso, não ocorra a formação de um pênis.

6- *Imposex* e espécies bioindicadoras

Atualmente, o *Imposex* é um problema generalizado (DE FUR et al., 1999) e aproximadamente 260 espécies de neogastrópodes já foram afetadas (TITLEY-O'NEAL et al., 2011). O primeiro relato foi descrito por Blaber (1970) como o desenvolvimento de um pênis atrás do tentáculo ocular direito em fêmeas de *Nucella lapillus* (L.), mas o termo foi designado por Smith (1971), após as

mesmas anormalidades terem sido observadas em *Nassarius obsoletus* (Say, 1822). A ocorrência e intensidade do *Imposex* são proporcionais aos níveis de contaminação por COEs no ambientais (MATTHIESSEN & GIBBS, 1998). Dessa maneira, este bioindicador tem sido utilizado em todo o mundo para mapear a poluição por COEs em ambientes marinhos (SOUSA et al., 2009). Os níveis de *Imposex* normalmente são medidos através de índices biométricos, tais como: índice do tamanho relativo do pênis (RPSI) (GIBBS et al., 1987), Índice Relativo do Comprimento do Pênis (RPLI) e Índice da Sequência do Vaso Deferente (VDSI), além de porcentagem de fêmeas afetadas.

De acordo com Bryan et al. (1987), o índice RPSI, que tem sido mais utilizado para os animais com estágio avançado de *Imposex* e é obtido pela equação $RPSI = (\text{comprimento do pênis em fêmeas média}) \times 3 / (\text{média do comprimento dos pênis nos machos}) \times 3 \times 100$. Já em fêmeas com níveis iniciais de *Imposex*, o índice mais adequado é o RPLI = $(\text{comprimento médio do pênis em fêmeas} / \text{comprimento médio do pênis em machos}) \times 100$. Ainda segundo esses autores, esses índices numéricos indicam os níveis de desenvolvimento do *Imposex* na amostra estudada.

O índice VDSI foi inicialmente proposto por Gibbs et al. (1987) para ser utilizado em *Nucella lapillus* (L.) e mais tarde modificado por vários autores para a aplicação com outras espécies de prosobrânquios (STROBEN et al., 1995; Horiguchi, 1998; FERNANDEZ et al., 2005; QUEIROZ et al., 2007). De um modo geral, o índice VDSI constitui uma verificação individual de seis fases diferentes de *Imposex* considerando os seguintes parâmetros: a formação do pênis e do canal deferente, o tamanho do pênis e a ligação ao vaso deferente, o bloqueio da vulva e a presença de cápsulas abortivas.

Devido ao alto custo das análises químicas das matrizes abióticas (água e sedimento), assim como a necessidade do uso de reagentes e equipamentos específicos, o monitoramento utilizando gastrópodes prosobrânquios como alternativa ao uso da água e sedimento tem sido uma prática em todo o mundo na detecção de COEs (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de gastrópodes prosobrânquios utilizadas mundialmente para biomonitoramentos

País	Espécie	Referência
Holanda	<i>Buccinum undatum</i> (L.)	Hallers-Tjabbes et al., 1994; Mensink et al., 1996
Malta	<i>Hexaplex trunculus</i>	Axiak et al., 1995
Inglaterra	<i>Ocenebra erinacea</i> (L.)	Gibbs et al., 1990; Gibbs, 1996
França		Oehlmann et al., 1996
Alemanha e Portugal	<i>Ocenebrina aciculata</i> <i>Hydrobia ulvae</i> (Pennant)	Schulte-Oehlmann et al., 1997, 1998; Galante-Oliveira et al., 2010
França, Inglaterra e Portugal	<i>Nassarius reticulatus</i> (L.)	Stroben et al., 1992; Bryan et al., 1993; Barroso & Moreira, 1998; Barroso et al., 2002b; Rato et al., 2006
França	<i>Nassarius (Hinia) incrassatus</i> (Strom)	Oehlmann et al., 1998
Espanha	<i>Nassarius (Hinia) nitidus</i> (Jeffreys, 1867)	Rodriguez et al., 2009
Inglaterra	<i>Nucella lapillus</i> (L.)	Bryan et al., 1986
Irlanda		Oehlmann et al., 1998 Minchin et al., 1996
Argentina	<i>Adelomelon ancilla</i> (Lightfoot, 1786)	Bigatti et al., 2009
Argentina	<i>Adelomelon beckii</i> (Broderip, 1836)	Arrighetti & Penchaszadeh, 2010;
Argentina	<i>Adelomelon brasiliana</i>	Penchaszadeh et al.,

	(L.)	2001; Bigatti et al., 2009;
Argentina	<i>Buccinanops cochlidium</i> (Dillwyn, 1817)	Bigatti et al., 2009
Argentina	<i>Buccinanops globulosus</i> (Kiener, 1834)	Bigatti et al., 2009
Argentina	<i>Buccinanops monilifer</i> (Kiener, 1834)	Penchaszadeh et al., 2001; Averbuj & Penchaszadeh, 2010
Argentina	<i>Olivancillaria</i> <i>deshayesiana</i> (Ducros de St. Germain, 1857)	Teso & Penchaszadeh, 2009
Argentina	<i>Odontocymbiola</i> <i>Megallanica</i> (Gmelin, 1791)	Bigatti & Penchaszadeh, 2005
Argentina	<i>Pareuthria plumbea</i> (Philippi, 1844)	Bigatti et al., 2009
Argentina	<i>Prunum Martini</i> (Petit de la Saussaye, 1853)	Bigatti et al., 2009
Argentina	<i>Trophon geversianus</i> (Pallas, 1774)	Bigatti et al., 2009
Venezuela	<i>Chichoreus brevifrons</i> (L.)	Miloslavich et al., 2007
Venezuela	<i>Chicoreus margaritensis</i> (Abbott, 1958)	Miloslavich et al., 2007
Brasil e Venezuela	<i>Leucozonia nassa</i> (Gmelin, 1791)	Castro et al., 2007 Miloslavich et al., 2007
Brasil	<i>Cymatium</i> <i>parthenopeum</i> (Salis	Castro et al., 2007 Costa et al., 2009

	Marschlins, 1793)	
Brasil	<i>Stramonita haemastoma</i> (Linnaeus, 1767)	Castro et al., 2007b
Brasil	<i>Stramonita rustica</i> (L.)	Castro et al., 2007 ^a
Brasil	<i>Thais deltoidea</i> (L.)	Costa et al., 2008
Brasil	<i>Voluta ebraea</i> (Linnaeus, 1758)	Castro et al., 2008
Brasil	<i>Nassarius vibex</i> (Say, 1822)	Lima-Verde et al., 2010 Cardoso et al., 2009
Chile	<i>Acanthina monodon</i> (Pallas, 1774)	Huaquin et al., 2004
Chile	<i>Chorus giganteus</i> (Lesson, 1831)	Gooding et al., 1999
Chile	<i>Nucella crassilabrum</i> (L.)	Gooding et al., 1999
Chile	<i>Xanthochorus</i> <i>cassidiformis</i> (Blainville, 1832)	Gooding et al., 1999
Chile	<i>Ximenopsis muriciformis</i> (King, 1832)	Bigatti et al., 2009
Tailândia	<i>Chicoreus capucinus</i> (L.)	Bech et al., 2002
Tailândia	<i>Thais distinguenda</i> (Dunker, 1866)	Bech et al., 2002

7- *Intersex*: Outra ferramenta de biomonitoramento

O *Intersex* foi observado pela primeira vez em 1993, no litoral da Alemanha, quando foram evidenciadas malformações no trato reprodutivo palial de fêmeas do gastrópode *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) (BAUER et al., 1995, 1997), as quais foram relacionadas a altos níveis de contaminação por

TBT. Esta espécie é considerada um bom bioindicador para locais onde não há neogastropodes e em áreas potencialmente poluídas (COSTA et al., 2013).

Essa síndrome se caracteriza pelo distúrbio fenotípico no trato reprodutivo, com a transformação gradual de órgãos reprodutivos paliais em estruturas morfológicamente masculinas, tendo sido classificada em cinco estágios (0-4) (BAUER et al., 1995):

- Estágio 0: a fêmea encontra-se normal, sem indícios de *Intersexualidade*.
- Estágio 1: a abertura genital feminina é aumentada por uma fenda proximal e a *bursa copulatrix* é dividida ventralmente.
- Estágio 2: ocorre a divisão da porção ventral do oviduto palial, expondo os lobos internos. Isso deve ser interpretado como uma característica do sexo masculino, pois a próstata nos machos caracteriza-se por um sulco aberto.
- Estágio 3: as glândulas do oviduto palial são totalmente ou em parte suplantadas por uma glândula prostática.
- Estágio 4: o pênis e o sulco seminal são formados nas fêmeas, que, entretanto, não apresentam espermiogênese.

Ainda segundo Bauer et al. (1995), nos estágios 2 ao 4, a malformação morfológica do oviduto inibe a formação da cápsula e a cópula, o que leva à esterilização das fêmeas. O principal parâmetro para a quantificação das intensidades da *Intersexualidade* em populações é o índice de *Intersex* (ISI), calculado como o valor médio de estágios *Intersex* por amostra, proposto por esses mesmos autores.

Após os primeiros estudos relatando a ocorrência de *Intersex*, vários outros estudos foram realizados utilizando *L. littorea* como bioindicadora (MINCHIN et al., 1996; BAUER et al., 1997; OEHLMANN et al., 1998; SUNDERMANN et al., 1998; BARROSO et al., 2000; DE WOLF et al., 2001; VAN DEN BROECK et al., 2007, 2009; RANK, 2009) especialmente onde os níveis de contaminação por TBT são

bastante elevados e as espécies de neogastrópodes não são encontradas. No Brasil, Costa et al. (2013) relataram *Intersex* em *Littoraria angulifera* (L.) no litoral do Espírito Santo, conforme a escala desenvolvida por Bauer et al. (1995) para *L. littorea*. Após este primeiro estudo, não houve mais monitoramentos utilizando *L. angulifera* na costa brasileira, apesar de se tratar de uma espécie muito abundante e estritamente ligada a estuários (REID, 2010).

8- Biomonitoramento da contaminação por COEs na costa brasileira

Praticamente todos os estudos relacionados ao biomonitoramento na costa brasileira utilizaram o *Imposex* como referencial. Os locais relatados como sendo de maior contaminação foram a Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil (FERNANDEZ et al., 2002, 2005) e Paranaguá (PR), São Francisco do Sul (SC), Itajaí (SC) e Rio Grande (RS), na região Sul (CASTRO et al., 2007). Em ambas as regiões, o *Imposex* foi fortemente relacionado com as fontes potenciais de contaminação (portos, marinas e estaleiros).

Os estudos realizados no Espírito Santo, Sudeste do Brasil, ao longo de cinco anos (de 2007 a 2012), mostraram que apesar do banimento mundial, a região continua contaminada por TBT, com relato de níveis de *Imposex* altos nas áreas próximas a portos e marinas (COSTA et al., 2013).

No nordeste da costa brasileira, os níveis de *Imposex* foram verificados nos estados do Ceará (Portos do Pecém e Mucuripe), Rio Grande do Norte (Porto de Natal), Paraíba (Porto do Cabedelo), Pernambuco (Porto do Recife e de Suápe), Alagoas (Porto de Jaraguá), Sergipe (estuário do rio Sergipe) e na Bahia (portos de Aratu e de Salvador) (CASTRO et al., 2007b). O estudo mostrou *Imposex* em todas as áreas monitoradas e os níveis foram relacionados com a intensidade do tráfego marinho, com a hidrodinâmica e a localização portuária (*inshore* ou *offshore*).

Assim, apesar do banimento mundial dos COEs, os resultados dos estudos têm mostrado contaminação por TBT em áreas costeiras do Brasil (CASTRO et al., 2012). Embora alguns órgãos governamentais considerem o problema do

TBT superado, visto que os níveis de contaminação foram reduzidos na Europa, Ásia e América do Norte, a realidade para a América Sul é que o problema ainda é muito persistente, o que indica que o banimento não vigore nos referidos países. Além disso, é sabido que cloreto e óxido de TBT são produzidos e comercializados no Brasil pela empresa CESBRA (vide CESBRA, 2016).

9 - Contaminação por COEs em regiões estuarinas

Os estuários são corpos semifechados que têm uma conexão livre com o mar e nos quais a água do mar se dilui, de forma mensurável, na água doce de origem continental (PRITCHARD, 1967). Esses corpos d'água, por formarem áreas protegidas ao longo da costa, são propícios ao assentamento humano, bem como ao estabelecimento de portos comerciais. As características físicas, químicas e hidrodinâmicas desses sistemas possibilitam condições favoráveis para o habitat de parte significativa dos recursos marinhos, o que os tornam de grande relevância biológica, atuando como áreas de criação e refúgio temporário ou permanente de várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos, que são, também, recursos básicos para a pesca artesanal e industrial. Dessa forma, os estuários são um importante meio de vida para as populações que retiram destes o seu sustento (SANTOS et al., 2009).

Os estuários estão entre os ambientes mais ameaçados na terra, com perda global de cerca de 35%, causada por impacto antrópico (VALIELA et al., 2001). Como já supracitado, é nesses sistemas que se encontram as principais fontes potenciais de contaminação por COEs, como portos, marinas e estaleiros, e é por esse motivo que nesses locais se observam as mais altas concentrações desses compostos. Devido à grande quantidade de matéria orgânica encontrada nesses sistemas e pelo fato de o sedimento ser uma matriz onde se acumulam COEs por longos períodos, estes são considerados sistemas alvo para esse tipo de contaminação (CASTRO et al., 2007; MACEDO et al., 2007).

Nos estuários se encontram uma variedade de nichos ecológicos que abrigam uma fauna diversa com representantes de diversos filos, mas há um pequeno

grupo de animais, principalmente moluscos, que mostram uma associação obrigatória com esses sistemas (PLAZIAT et al., 2001). Dentre estes, Littorinidae (Gastropoda) é uma das famílias mais conspícuas (REID et al., 1996). Devido a essa associação obrigatória aos estuários, a utilização de espécies deste grupo para o biomonitoramento é relevante na avaliação da contaminação por COEs.

10- *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) – Um novo biomonitor para regiões estuarinas

Littoraria angulifera (Caenogastropoda) é uma espécie neotropical que ocorre em florestas de mangue do Oceano Atlântico e no Caribe, ocupando zonas de supralitoral. Na maior parte das vezes ocorre abundantemente nos troncos e raízes das árvores do mangue, mas também é encontrada ocupando substratos consolidados naturais ou artificiais em enseadas abrigadas. É uma espécie facilmente identificável no ambiente (REID et al., 1986; MERKET & ELLISON, 1998; MATTHEWS-CASCON & LOTUFO, 2006). A classificação taxonômica da espécie está informada no Apêndice 1.

Esse gastrópode apresenta variações em suas características fenotípicas, como na morfologia da concha e polimorfismos de cores, que lhe permite explorar vários ambientes (CHAPMAN, 1995; 1997; LEE & WILLIAMS, 2002; REID et al., 2010). Tem hábito alimentar detritívoro e micrófago, alimentando-se de algas, esponjas e microrganismos (GUTIERREZ, 1988) e por esse motivo é uma espécie partícipe no fluxo de nutrientes em estuários, por ser elo entre os produtores primários e os consumidores (MERKET & ELLISON, 1998).

Sua concha pode atingir até 30 mm de comprimento (altura). De espiral longa cônica e volta corporal lisa, apresenta teleoconcha com seis a oito voltas. A abertura da concha possui formato oval com lábio columelar liso e lábio externo fino. A concha apresenta alta plasticidade cromática, sendo mais comum apresentar coloração bege com manchas irregulares axiais que variam da cor marrom a laranja (Figura 2). Um opérculo córneo fino de cor marrom claro

também está presente nesta espécie (MATTHEWS-CASCON & LOTUFO, 2006).



Figura 2. Concha de *Littoraria angulifera*. A: Vista dorsal. B: Vista anterior mostrando a abertura do opérculo (Fonte: Autora).

Algumas adaptações de *L. angulifera*, além da arquitetura e o polimorfismo, (REID, 1986; MCKILLUP & MCKILLUP, 2008), é a velocidade dos animais (OHGAKI, 1992; LEE & WILLIAMS, 2002), a plasticidade dos dentes da rádula (REID & MAK, 1999) e a ovoviviparidade, ou seja, nessa espécie está ausente a glândula de cápsula, sendo que os ovos formam uma camada espessa, o qual são retidos no interior da cavidade do manto a partir dos quais eclodem em larvas véliger. A duração da fase larval ainda não foi estimada diretamente, mas presume-se que dure entre 3 a 10 semanas, com base na comparação com a protoconcha de outros litorinídeos e com o intervalo entre a desova e o recrutamento (REID, 1989).

Na costa brasileira, *L. angulifera* ocorre do Ceará até Santa Catarina, inclusive em ilhas oceânicas, sendo muito abundante na região costeira do Nordeste do país (REID, 1989; MATTHEWS-CASCON & LOTUFO, 2006). É um gastrópode de fácil captura e de associação obrigatória ao sistema estuarino,

mas, apesar disto, poucos estudos o utilizam como bioindicador da qualidade ambiental nesses ambientes (MARTÍNEZ et al., 2013).

No Brasil, a contaminação por COEs vem sendo estudada utilizando o *Imposex* em diversas espécies marinhas da ordem Neogastropoda (Tabela 2). Entretanto, até o momento, apenas um estudo, realizado na costa do Espírito Santo (COSTA et al., 2013), com o intuito de verificar a contaminação por COEs nos manguezais, utilizou *L. angulifera* como bioindicadora. Apesar de ser menos sensível à contaminação por COEs do que os neogastrópodes (BAUER et al., 1995), essa espécie é uma opção para monitorar a presença de COEs onde neogastrópodes não estão presentes e, principalmente, em áreas de manguezal.

11 - Prospecções futuras para monitoramentos de COEs

Embora haja uma relação clara entre a contaminação por organoestânicos e os gastrópodes, é difícil comparar, numa escala global, os resultados obtidos com diferentes espécies, haja visto que cada uma apresenta particularidades biológicas que afetam a intensidade do *Imposex* e do *Intersex* (BECH, 1999). Como já visto, apesar do banimento mundial, o Brasil continua a apresentar poluição por COEs e dessa forma, são necessários monitoramentos contínuos com a finalidade de avaliar a evolução deste cenário em nível nacional e propor medidas legais efetivas para a não utilização de tintas AI à base desses compostos. Uma alternativa para esses vieses, utilizada nos monitoramentos da União Européia (UE), é a *Water Framework Directive* (WFD). Trata-se de uma ferramenta legislativa de abordagem ecossistêmica que combina todos os elementos (biológicos, hidromorfológicos, químicos e físico-químicos) e, através dos resultados encontrados, classifica o estado ecológico do corpo d'água em cinco classes em termos de qualidade (alta, boa, moderada, pobre, ruim). Para garantir a comparabilidade entre os países membros da UE, os resultados dos monitoramentos são apresentados como Relação de Qualidade Ambiental (EQR), que varia entre 1 (o melhor estado ecológico possível do corpo de água) e zero (desvio máximo das condições de referência e refletindo o pior status) (CE, 2000). Laranjeiro et al. (2015) utilizaram essa ferramenta para avaliar a qualidade

ambiental sobre o impacto da poluição por TBT na Ria de Aveiro, Portugal. Os resultados obtidos mostraram uma melhoria considerável da qualidade ambiental ao longo de 15 anos, tendo-se alcançado um bom estado ecológico em 2013.

Uma alternativa para a compilação dos dados da costa brasileira seria a utilização desta ferramenta. Dessa forma, seria possível comparar diferentes locais e espécies ao longo do tempo e acompanhar o verdadeiro quadro de utilização das tintas AI à base de COEs em nível nacional. Esta poderia ser uma medida eficiente, rápida e barata para a criação de uma legislação nacional efetivamente proibitiva quanto à utilização de organoestânicos como biocidas.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, p. 2-20, 2007.

ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**. v. 258, p. 99-102, 2000.

ALZIEU, C. Biological effects of tributyltin on marine organisms. In: **Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant**. DE MORA, S. J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 167-209.

ALZIEU, C. TBT Detrimental Effects on Oyster Culture in France - Evolution since antifouling paint regulation. **Oceans**, p. 1130-1134, 1986.

ALZIEU, C.; HERAL, M.; THIBAUD, Y.; DARDIGNAC, M. J.; FEUILLET, M. Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. **Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes**, v. 45, p. 101-116, 1981.

ALZIEU C.; SANJUAN, J.; DELTREIL, J. P.; BOREL, M. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, p. 494-498, 1986.

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

AONO, A.; TAKEUCHI, I. Effects of tributyltin at concentrations below ambient levels in seawater on *Caprella danilevskii* (Crustacea: Amphipoda: Caprellidae). **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 515-523, 2008.

ARRIGHETTI F.; PENCHASZADEH P. E. Gametogenesis, seasonal reproduction and *Imposex* of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. **Aquatic Biology**, v. 9, p. 63-75, 2010.

AVERBUJ, A.; PENCHASZADEH. P. E. On the reproductive biology and impact of *Imposex* in a population of *Buccinanops monilifer* from Mar del Plata, Argentina. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 90, p. 729-734, 2010.

AXIAK, V.; VELLA, A. J.; MICALLEF. D.; CHIRCOP. P.; MINTOFF, B. *Imposex* in *Hexaplex Trunculus* (Gastropoda, Muricidae) - First Results from Biomonitoring of Tributyltin Contamination in the Mediterranean. **Marine Biology**, v. 121, p. 685-691, 1995.

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

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

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.

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

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

BECH, M. Sensitivity of different Gastropod to Tributyltin contamination. **Phuket Marine Biological Center Special Publication**, v. 19, p. 1-6, 1999.

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

BECKER VAN-SLOOTEN, K.; TARRADELLAS, J. Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, p. 755-762, 1994.

BIGATTI, G.; PENCHASZADEH, P. E. *Imposex* in *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) in Patagonia. **Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay**, v. 88, p. 371-375, 2005.

BIGATTI, G.; PRIMOST, M. A.; CLEDÓN, M.; AVERBUJ, A.; THEOBALD N.; GERWINSKI, W.; ARNTZ, W.; MORRICONI, E.; PENCHASZADEH, P. E. Biomonitoring of TBT contamination and *Imposex* incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 695-701, 2009.

BLABER, S. J. M. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). **Journal of Molluscan Studies**, v. 39, p. 231-233, 1970.

BRYAN, G. W.; BURT, G. R.; GIBBS, P. E.; PASCOE, P. L. *Nassarius reticulatus* (Nassariidae, Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after tbt restrictions. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 73, p. 913-929, 1993.

BRYAN, G. W.; GIBBS, P. E.; HUMMERSTONE, L. G.; BURT, G. R. The decline of the Gastropod *Nucella lapillus* around Southwest England - Evidence for the effect of Tributyltin from Antifouling Paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 66, p. 611-640, 1986.

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

CASTRO, I. B.; BEMVENUTI, C. E.; FILLMANN, G. Preliminary appraisal of *Imposex* in areas under the influence of southern Brazilian harbors. **Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology**, v. 2, p. 73-79, 2007a.

CASTRO, I. B.; LIMA, A. F. A.; BRAGA, A. R. C.; ROCHA-BARREIRA, C. A. *Imposex* in two muricid species (Mollusca: Gastropoda) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology**, v. 2, p. 81-91, 2007b.

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

CESBRA. Chemical products marketed by CESBRA. <http://www.cesbra.com.br/site/quimicos.asp>. 2016.

CHAMP, M. A. The need for the formation of an independent, international marine coatings board. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p. 239-246, 1999.

CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment**, v. 258, p. 21-71, 2000.

CHAMP, M. A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 935-940, 2003.

CHAPMAN, M. G. Spatial patterns of shell of three species of co-existing Littorinid snails in New South Wales, Australia. **Journal of Molluscs Studies**, v. 61, p. 141-162, 1995.

CHAPMAN, M. G. Relationships between shell shape, water reserves, survival and growth of highshore Littorinids under experimental conditions in New South Wales, Australia. **Journal of Molluscs Studies**, v. 63, p.511- 529, 1997.

CHAPMAN, P. M. Ecotoxicology and pollution - Key issues. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 167-177, 1995.

CHIEN, L. C.; HUNG, T. C.; CHOANG, K. Y.; YEH, C. Y.; MENG, P. J.; SHIEH, M. J.; HAN, B. C. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. **The Science of the Total Environment**, v. 285, p. 177-185, 2002.

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

CHOI, M.; HYO-BANG MOON, H. B.; CHOI, H. G. Intake and potential health risk of butyltin compounds from seafood consumption in Korea. **Archives of Environmentl Contaminants and Toxicology**, v. 15, p. 333-340, 2011.

CLARK, R. B. **Marine Pollution**. Clarendon Press, Oxford, p. 172, 1992.

CONAMA. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 357, **Diário Oficial da União**, Brasil, p. 63, 2005.

COSTA, M. B.; OTEGUI, M. B. T.; BARBEIRO, D. C.; FERNANDEZ, M. A. *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (Von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae): A New Bioindicator of Organotin Compounds Contamination? **Journal of the Brazilian Societ of Ecotoxicology**, v. 3, p. 65-69, 2009.

COSTA, M. B.; ZAMPROGNO, G. C.; PEDRUZZI, F. C.; DALBEM, G. B.; TOGNELLA, M. M. P. Assessing the continuous impact of tributyltin from antifouling paints in a Brazilian mangrove area using *Intersex* in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as biomarker. **International Journal of Oceanography**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

DE MORA, S. J. The Tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. In: **Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant**. DE MORA, S. J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 1-15.

DE WOLF, H.; DE COEN, W.; BACKELJAU, T.; BLUST, R. *Intersex* and sterility in the periwinkle *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along the Western Scheldt estuary. **The Netherlands. Marine Environmental Research**, v. 52, p. 249-255, 2001.

DEFUR, P. L.; CRANE, M.; INGERSOLL, C. G.; TATTERSFIELD, L. **Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment**. Pensacola: SETAC Press, 1999.

DÍEZ, S.; ABALOS, M.; BAYONA, J. M. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. **Water Research**, v. 36, p. 905-918, 2002.

DPMA. Prefectura Naval Argentina. Ordenanza 4/98 Tomo 6. **Régimen para la protección del medio ambiente**. Anexo 1. 1998.

EC. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. **Official Journal of European Union**, xx, p. 1-73, 2000.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in toxicology**, v. 26, p. 3-117, 1996.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letter**, v. 353, p. 140-141, 2003.

FERNANDEZ, M. A. S.; LIMAVERDE, A. C.; CASTRO, I. B.; WAGENER, A. L. R.; ALMEIDA, A. C. O. Occurrence of *Imposex* in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Reports in Public Health**, v. 18, p. 463-476, 2002.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal of Environment and Health**, v. 1, p. 427-448, 2007.

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

GABBIANELLI, R.; MORETTI, M.; CARPENÈ, E.; FALCIONI, G. Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalvis*) erythrocytes assessed by the comet assay. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 163-169, 2006.

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

GARAVENTA, F.; FAIMALI, M.; TERLIZZI, A. *Imposex* in pre-pollution times. Is TBT to blame? **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 696-718, 2006.

GIBBS, P. E. Oviduct malformation as a sterilizing effect of tributyltin (TBT)-induced *Imposex* in *Ocenebra erinacea* (Gastropoda: Muricidae). **Journal of Molluscan Studies** v. 62, p. 403-413, 1996.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. M. Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the *Imposex* response of neogastropod mollusks. In: **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**. KEES, J. M. KRAMER (ed.) CRC Press Inc, Boca Ratón, EUA, 1994. p. 2005-226.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W. TBT paints and demise of the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda). In: **Oceans 1987**. Proceedings International Organotin Symposium Proceedings, Marine Technology Society, Washington, DC, 1987. v. 4, p. 1296-1308.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. M.; PASCOE, P. L.; BURT, G. R. The use of dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 67, p. 507-523, 1987.

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

GIBBS, P. E.; PASCOE, P. L.; BRYAN, G. W. Tributyltin induced *Imposex* in stenoglossan gastropods: pathological effects on the female reproductive system. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100c, p. 231-235, 1991.

GIPPERTH, L. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 86-95, 2009.

GODOI, A. F. L.; MONTONE, R. C.; SANTIAGO-SILVA, M. Determination of butyltin compounds in surface sediments from the Sao Paulo State coast by Gas Chromatography – Pulsed Flame Photometric Detection. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 205-210, 2003.

GOLDBERG, J. I. TBT: an environmental dilemma. **Environment**, v. 28, p. 17-44, 1986.

GOODING, M.; GALLARDO, C.; LEBLANC, G. *Imposex* in three marine gastropod species in Chile and potential impact on muriciculture. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p. 1227-1231, 1999.

GRÜN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R.; GARDINER, D. M.; KANNO, J.; IGUCHI, T.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of

adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2141–2155, 2006,

GUTIERREZ, P. C. The ecology and behavior of the periwinkle, *Littorina angulifera*. **Biotropica**, v. 20, p. 352- 356, 1988.

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

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, p. 719-743, 2001.

HORIGUCHI, T. *Imposex* in marine gastropods. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 64, p. 907- 908, 1998.

HORIGUCHI, T.; TAKIGUCHI, N.; CHO, H. S.; KOJIMA, M.; KAYA, M.; SHIRAIISHI, M.; MORITA, M.; HIROSE, H.; SHIMIZU, M. Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 223-229, 2000.

HUAQUIN, L. G.; OSORIO, C.; VERDUGO, R.; COLLADO, G. Morphological changes in the reproductive system of females *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) affected by *Imposex* from the coast of central Chile. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 46, p. 111-117, 2004.

IMO, 1999. **Sistemas antiincrustantes: hacia una solución no tóxica**. La OMI al Día International Maritime Organization, London, pp. 1-32. Disponível em: <http://www.imo.org/includes/blastDataOnly.asp/data_id%3D2319/Antifoulingspanish.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2016.

IMO, 2002. **Anti-fouling systems**. Focus on IMO. International Maritime Organization, London, p. 1-31. Disponível em: http://www.imo.org/includes/blastDataOnly.asp/data_id%3D7986/FOULING2003.pdf. >. Acesso em: 29 jul. 2016.

IMO. Summary of the status of conventions as at 31 May 2007. **International Maritime Organization, United Kingdom**, 2008.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p.77-85, 2009.

LARANJEIRO, F.; SÁNCHEZ-MARIN, P.; GALANTE-OLIVEIRA, S; BARROSO, C. Tributyltin pollution biomonitoring under the Water Framework Directive: Proposal of a multi-species tool to assess the ecological quality status of EU water bodies. **Ecological Indicators**, v. 57, p. 525-535, 2015.

LEE, O. H. K.; WILLIAMS, G. A. Spatial distribution patterns of *Littoraria* species in Hong Kong mangroves. **Hydrobiologia**, v. 481, p.137-145, 2002.

LIMA-VERDE F. B.; CASTRO Í. B.; ROCHA-BARREIRA C. D. A. *Imposex* occurrence in *Nassarius vibex* from South America: a potential bioindicator in estuarine environments. **Marine Biodiversity Records**, v. 3, p. 1-4, 2010.

LUDGATE, J. Economic and technological impact of TBT legislation on the USA marine industry. **Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference**. v. 4, p. 1309-1313, 1987.

LUZ, M. S.A; BOEHS, G. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 7, p. 120-128, 2015.

MACHADO, R. A. S. O meio natural na organização produtiva da população pesqueira tradicional do município de Canavieiras/BA. 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

MACEDO, S. J.; PHILIPPINI DA SILVA, H. K.; BRAYNER, F. M. M.; DUARTE, M. M. M. B.; BARBOSA, A. M. F. Heavy metal concentrations in sediments of the Capibaribe river estuary in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco-Brazil. **WIT Transactions on Ecology and the Environment**, v. 102, p. 3, 2007.

MAGUIRE, R. J. The occurrence, fate and toxicity of tributyltin and its degradation products in fresh water environments. In: **Tributyltin: case study of an environmental contaminant**. DE MORA S. J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 94–138.

MARINHA DO BRASIL, DIRETORIA DE PORTOS E COSTA. **Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas antiincrustantes em embarcações**. NORMAM-23/DPC. 2007.

MARTÍNEZ, S.; MAHIQUES, M. M.; BURONE, L. Mollusks as indicators of historical changes in an estuarine-lagoonal system (Cananéia-Iguape, SE, Brazil). **The Holocene**, v. 23, p. 888-897, 2013.

MATTHEWS-CASCON, H.; LOTUFO, T. M. C. Biotá marinha da costa oeste do Ceará. **Série Biodiversidade**, Brasília: MMA, v. 24, p. 248, 2006.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 37-43, 1998.

MCALLISTER, B. G.; KIME, D. E. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinization and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 309-316, 2003.

MCKILLUP, S. C.; MCKILLUP, R. V. Apostasy and selection for crypsis in the marine snail *Littoraria filosa*: an explanation for a balanced colour

polymorphism. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 95, p. 62-71, 2003.

MENSINK, B. P.; HALLERS-TJABBES, C. C. T.; KRALT, J.; FRERIKS, I. L.; BOON, J. P. Assessment of *Imposex* in the common whelk, *Buccinum undatum* (L.) from the Eastern Scheldt, the Netherlands. **Marine Environmental Research**, v. 41, p. 315-325, 1996.

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

MILOSLAVICH, P.; PENCHASZADEH, P. E.; BIGATTI, G. *Imposex* in gastropods from Venezuela. **Ciencias Marinas**, v. 33, p. 319-324, 2007.

MINCHIN, D.; STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; BAUER, B.; DUGGAN, C. B.; KEATINGE, M. Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p.188-195, 1996.

NISHIKAWA, J. I.; MAMIYA, S.; KANAYAMA, T.; NISHIKAWA, T.; SHIRAISHI, F.; HORIGUCHI, T. Involvement of the Retinoid X Receptor in the development of *Imposex* caused by organotins in gastropods. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 6271-6276, 2004.

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

OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; BAUER, B. *Imposex* development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Strom, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). **Aquatic Toxicology**, v. 43, p. 239-260, 1998.

OHGAKI, S. Distribution and movement of the mangrove *Littoraria* (Gastropoda) on Ishigaki Island, Okinawa. **Venus**, v. 51, p. 269-278, 1992.

OKAMURA, H.; MIENO, H. Em Handbook of Environmental Chemistry: Antifouling Paints Biocides; Konstantinou, I. K., ed.; Springer-Verlag, Berlin, 2006.

PAGE, D. S.; DASSANAYAKE, T. M.; GILFILLAN, E. S. Relationship between tissue concentrations of tributyltin and shell morphology in field populations of *Mytilus edulis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 500-504, 1996.

PENCHASZADEH, P. E.; AVERBUJ, A.; CLEDON, M. *Imposex* in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 790-791, 2001.

PETERSEN, S.; GUSTAVSON, K. Toxic effects of tri-butyl-tin (TBT) on autotrophic pico-, nano-, and microplankton assessed by a size fractionated

pollution-induced community tolerance (SF-PICT) concept. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 253-264, 1998.

PINOCHET, H.; TESSINI, C.; BRAVO, M.; QUEIROZ, W.; DE GREGORI, I. Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay-Chile. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 155, p. 341–353, 2009.

PLAZIAT, J. C.; CAVAGNETTO, C.; KOENIGUER, J. C.; BALTZER, F. History and biogeography of the mangrove ecosystem, based on a critical reassessment of the paleontological record. **Wetlands Ecology and Management**, v. 9, p. 161-179, 2009.

PRITCHARD, D. W. Observation of circulation in coastal plain estuaries. In: **Estuaries**. LAUFF, J. H. ed. Estuaries, Washington, AAAS, 1967. p. 37-44.

QUEIROZ, L.; CASTRO, I. B.; ROCHA-BARREIRA, C. A. New *Imposex* development index (idi) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): A transplantation experiment in the Brazilian northeast. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 249-256, 2007.

RANK, J. *Intersex* in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1271-1277, 2009.

RATO, M.; SOUSA, A.; QUINTA, R.; LANGSTON, W. J.; BARROSO, C. M. Assessment of inshore/offshore tributyltin pollution gradients in the northwest Portugal continental shelf using *Nassarius reticulatus* as a bioindicator. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 3213-3220.

READMAN, J. W. Development, occurrence and regulation of antifouling paint biocides: historical review and future trends. In: **Antifouling paint biocides**. I. KONSTANTINOU, (ed.). Springer, Berlin Heidelberg, Germany, 2006. p. 1-16.

REID, D. G. The **Littorinid molluscs of mangrove forests in the indo-pacific region: the genus *Littoraria***. British Museum (Natural History), London. p. 228, 1986.

REID, D. G. The comparative morphology, phylogeny and evolution of the gastropod family Littorinidae. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 324, p. 1– 110, 1989.

REID, D. G. **Systematics and Evolution of Littorina**. Ray Society, London. p. 463, 1996.

REID, D. G.; DYAL, P.; WILLIAMS, S. T. Global diversification of mangrove fauna: a molecular phylogeny of *Littoraria* (Gastropoda: Littorinidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 185-201, 2010.

REID, D. G.; MAK, Y. M. Indirect evidence for ecophenotypic plasticity in radular dentition of *Littoraria* species (Gastropoda: Littorinidae). **Journal of Molluscs Studies**, v. 65, p. 355–370, 1999.

RODRÍGUEZ, J. G.; TUEROS, I.; BORJA, A.; FRANCO, J.; IGNACIO, G. A. J.; GARMENDIA, J. M.; MUXIKA, I.; SARRIEGO, C.; VALENCIA, V. Butyltin compounds, sterility and *Imposex* assessment in *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), prior to the 2008 European ban on TBT antifouling paints, within Basque ports and along coastal areas. **Continental Shelf Research**, v. 29, p. 1165-1173, 2009.

RUIZ, J. M.; QUINTELA, M.; BARREIRO, R. Ubiquitous *Imposex* and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): a possible effect of nearshore shipping. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 164, p. 237-244, 1998.

SANTOS, T. G.; BEZERRA-JUNIOR, J. L.; COSTA, K. M. P.; FEITOSA, F. A. N. Dinâmica da biomassa fitoplanctonica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia do Pina, Recife, PE). **Revista Brasileira de Engenharia da Pesca**, v. 4, p. 95-109, 2009.

SANTOS, D. M.; SANT'ANNA, B. S.; GODOI, A. F. L.; TURRA, A.; MARCHI, M. R. R.; Contamination and impact of organotin compounds on the Brazilian coast. In: **Pollution Monitoring**. ORTIZ, A. C., GRIFIN N. B. (eds.) Nova Science Publishers, Hauppauge NY, 2009. p. 31-59.

SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; FIORONI, P.; BAUER, B. *Imposex* and reproductive failure in *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia). **Marine Biology**, v. 128, p. 257-266.

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO – SDA. Bahia, Salvador, 2016. Salvador (BA).

SHIM, W. J.; HONG, S. H.; YIM, U. H.; KIM, N. S.; OH, J. R. Horizontal and vertical distribution of butyltin compounds in sediments from shipyards in Korea. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 0277–0283, 2002.

SHIMASAKI, Y.; KITANO, T.; OSHIMA, Y.; INOUE, S.; IMADA, N.; HONJO, T.; Tributyltin causes masculinization in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 141-144, 2003.

SIDHARTHAN, M.; YOUNG, K. S.; WOUL, L. H.; SOON, P. K.; SHIN, H. W. TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 177-180, 2002.

SINGH, A. P.; BRAGG, P. D. The action of tributyltin chloride on the uptake of proline and glutamine by intact cells of *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 57, p. 1376-1383, 2002.

SMITH, B. S. Sexuality in the American mud-snail *Nassarius obsoletus* Say. **Proceedings of the Malacological Society of London**, v. 39, p. 377-378, 1971.

SMITH, P. J. Selective decline in *Imposex* levels in the dogwhelk *Lepsiella scobina* following a ban on the use of TBT antifoulants in New Zealand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 362-365, 1996.

SONAK, S.; PANGAM, P.; GIRIYAN, A.; HAWALDAR, K. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 96-108, 2009.

SOUSA, A.; IKEMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; BARROSO, C.; TANABE, S. Distribution of synthetic organotins and total tin levels in *Mytilus galloprovincialis* along the Portuguese coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 130-1136, 2009.

STERNBERG, R. M.; HOTCHKISS, A. K.; LEBLANC, G. A. Synchronized expression of retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an *Imposex*-susceptible mollusc. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 1345-1351, 2008.

STEWART, C. The efficacy of legislation. In: **Tributyltin: case study of an environmental contaminant**. DE MORA, S. J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 264-297.

STEWART, C.; DEMORA, S. J.; JONES, M. R. L.; MILLER, M. C. *Imposex* in New-Zealand Neogastropods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, p. 204-209, 1992.

STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; FIORONI, P. The morphological expression of *Imposex* in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. **Marine Biology**, v. 113, p. 625- 636, 1992.

STROBEN, E.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; FIORONI, P.; OEHLMANN, J. A comparative method for easy assessment of coastal TBT pollution by the degree of *Imposex* in prosobranch species. **Haliotis**, v. 24, p. 1-12, 1995.

SUNDERMANN, G.; BAUER, B.; OEHLMANN, J. Ultrastructure of prostate gland tissue in males and females with *Intersex* phenomena of *Littorina littorea* L. **Hydrobiologia**, v. 378, p. 227-233, 1998.

TAKEUCHI, A.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; MIYAZAKI, N. Caprella watch: a new approach for monitoring butyltin residues in the ocean. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 97-113, 2001.

TESO, S. V.; PENCHASZADEH, P. E. Beach filling and *Imposex* in *Olivancillaria deshayesiana* (Mollusca: Gastropoda: Olividae) from the coast of Mar del Plata, Argentina. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 89, p. 557-562, 2009.

TITLEY-O'NEAL, C.P., MUNKITTRICK, K.R., MACDONALD, B.A. The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring*. v. 13, 2360-2388, 2011.

VALIELA, I.; BOWEN, J. L.; YORK, J. K. Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments. **BioScience**, v. 51, p. 807-815, 2001.

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

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

WANG, B. A.; LI, M.; UM, Y. M.; LU, Z. H.; LI, J. Y. Effects of tributyltin chloride (TBT) and triphenyltin chloride (TPT) on rat testicular Leydig cells. **Zhonghua Nan Ke Xue**, v. 12, p. 516-519, 2006.

YEBRA, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology: past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 50, p. 75-104, 2004.

CAPÍTULO 2

**ASSESSMENT OF TRIBUTYLTIN CONTAMINATION BASED ON
IMPOSEX IN
Stramonita rustica (MOLLUSCA: GASTROPODA) ALONG SOUTHERN
BAHIA
COAST, NORTHEASTERN BRAZIL**

Artigo submetido ao periódico: **Brazilian Journal of Biology** - ISSN:1519-6984. Fator de Impacto (JCR) = 0,783

Aprovado em: 18/07/2016

Publicado em: Março de 2017

Normas da revista: Anexo I

Avaliação da contaminação por tributilestanho baseada em imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) ao longo da costa sul da Bahia, Nordeste do Brasil

Zeidan, GC. and Boehs, G.*

Laboratório de Moluscos Marinhos, Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade

Estadual de Santa Cruz (UESC)

Rodovia Jorge Amado, km 16, CEP 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil

*E-mail: gabizeidan@hotmail.com

Abstract

This study investigated the effects of tributyltin (TBT) on the morphology of the genital system of the gastropod *Stramonita rustica* in southern Bahia, Brazil. For this, 330 specimens were collected during the summer of 2014 at eight sampling points to ascertain whether male sex organs had developed in addition to the complete female genital tract in females (= Imposex). The analyses were made under a stereoscopic microscope. Imposex and their associated indexes, and the sterile females, exhibited the highest rates in harbors and shipyards areas. Despite the total ban of TBT in anti-fouling paints on a global scale since 2003, the results of this and other studies indicate the continued use of those paints on the Brazilian coast. This shows the inefficiency of existing legislation and the need to strengthen enforcement of the ban.

Keywords: antifouling, sterilization, harbors, TBT.

Resumo

Este estudo investigou os efeitos de tributil-estanho (TBT) sobre a morfologia do sistema genital do gastrópode *Stramonita rustica* (Lamarck, 1822) no Litoral Sul da Bahia, Brasil. Para isso, 330 espécimens foram coletados durante o verão de 2014 em oito pontos de amostragem, para verificar se os órgãos sexuais masculinos tinham se desenvolvido para além do trato genital feminino completo (= Imposex). As análises foram feitas sob um microscópio estereoscópico. O imposex e seus índices associados, assim como as fêmeas estéreis, apresentaram as maiores taxas em áreas portuárias e estaleiros. Apesar da proibição total do TBT em tintas anti-incrustantes em escala global desde 2003, os resultados deste e de outros estudos indicam a continuidade de uso dessas tintas na costa brasileira. Isso mostra a ineficácia da legislação vigente e reforça a necessidade de se cumprir integralmente o banimento.

Palavras-chave: antifouling, esterilização, portos, TBT.

Introdução

O composto orgânico tributilestano (TBT), utilizado como biocidas em tintas anti-incrustantes desde meados da década 1960, foi considerado por Goldberg (1986) o de maior toxicidade entre os compostos e o contaminante antropogênico mais prejudicial já produzido e deliberadamente introduzido nos ecossistemas aquáticos até o momento. Devido ao efeito adverso sobre os organismos marinhos, a Organização Marinha Internacional (IMO) banuiu mundialmente sua utilização em aplicações marítimas em 2003, para vigorar efetivamente em 2008 (Bekri et al., 2006). No Brasil, a Marinha do Brasil (MB) também suspendeu o uso de tintas antincrustantes à base de TBT em seus navios em 2003. Mas, pequenas embarcações continuaram usando tintas antincrustantes com TBT. Por causa disso, em 2007 a NORMAN/23 (MB) restringiu o uso de compostos orgânicos em tintas *antifouling* em todas as embarcações registradas.

O TBT pode causar efeitos negativos em vários grupos taxonômicos e entre estes os moluscos aparecem como os invertebrados mais sensíveis a este composto (Bryan e Gibbs, 1991). Conseqüentemente, estes organismos são excelentes sentinelas para o monitoramento do TBT em ambientes marinhos (Shim et al., 2002). Por exemplo, o TBT é a causa de defeitos nas conchas de bivalves (Bryan e Gibbs, 1991) e também atua como disruptor endócrino em gastrópodes (Smith, 1971).

O *Imposex* ocorre em neogastrópodes e é caracterizado pelo desenvolvimento dos órgãos sexuais masculinos (pênis e/ou vaso deferente) em adição ao trato genital feminino completo (Smith, 1971). Devido a essa síndrome ser de fácil diagnose, tem sido usada com sucesso como um biomonitor eficiente para determinar a presença e o grau de poluição por TBT. Atualmente, o *Imposex* é amplamente distribuído (de Fur et al., 1999) e aproximadamente 260 espécies de neogastrópodes são afetadas (Titley-O'Neal et al., 2011).

A costa sul do estado da Bahia, nordeste do Brasil, possui um grande nível de atividades náuticas, com presença de portos, atracadouros, marinas e muitos barcos de pequeno porte. Além disso, é uma região geograficamente diversa, com a presença de manguezais, recifes de coral e bancos de areia ao longo da sua costa. Até o momento, não há informações a respeito da ação do TBT em organismos marinhos nesta área. O objetivo deste estudo foi investigar a contaminação nessa região, utilizando o gastrópode *Stramonita rustica* (Neogastropoda: Muricidae) como biomarcador.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

As amostragens foram realizadas durante o verão de 2014 entre as latitudes 13 a 16°S, no Litoral Sul da Bahia (Figura 1). Foram coletados 330 exemplares de *Stramonita rustica*, em ambientes com substrato consolidado, como rochas, bancos de areia e recifes de coral, todos próximos a portos, atividades náuticas e marinas, onde havia a presença de atividades de pequenas embarcações. As estações de coleta foram escolhidas de acordo com a ocorrência da espécie em quantidade representativa por captura ($n \geq 30$), sempre em locais com a presença de atividades portuárias e pesqueiras. Portanto, os municípios de Ilhéus, Maraú, Itacaré e Canavieiras foram investigados, mas essa espécie não foi encontrada nos dois últimos locais.

2.2. Procedimentos laboratoriais

Todos os gastrópodes foram medidos com aproximação de 0,01 mm, com o auxílio de um paquímetro digital e depois narcotizados em solução de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) a 7% (volume/soluto) por uma hora. Em seguida, as conchas foram quebradas com o auxílio de uma morsa (torno de mesa). A morfologia externa do aparelho reprodutor foi analisada sob microscópio estereoscópico. O comprimento do pênis foi medido com aproximação de 0,01 mm, utilizando paquímetro digital. A

proporção sexual (M: F) foi calculada de acordo com Birchenough et al. (2002). Foram calculadas também as porcentagens de fêmeas com alterações morfológicas sexuais I (%). Para determinar os níveis de *Imposex*, foi avaliada a média do comprimento do pênis feminino (FPL) e masculino (MPL), usando o comprimento relativo do pênis (RPL), cálculo proposto por Gibbs e Bryan (1987). Também foi calculado o índice da sequência do vaso deferente (VDS), proposto por Gibbs e Bryan (1994).

2.3. Análises estatísticas

Uma matriz usando o coeficiente de Pearson foi criada para analisar as correlações entre o tamanho dos animais e o comprimento do pênis nas fêmeas e nos machos, em cada local de coleta; o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar a diferença entre o tamanho dos animais e o comprimento do pênis, em ambos os sexos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica. O nível de significância utilizado foi de 95%.

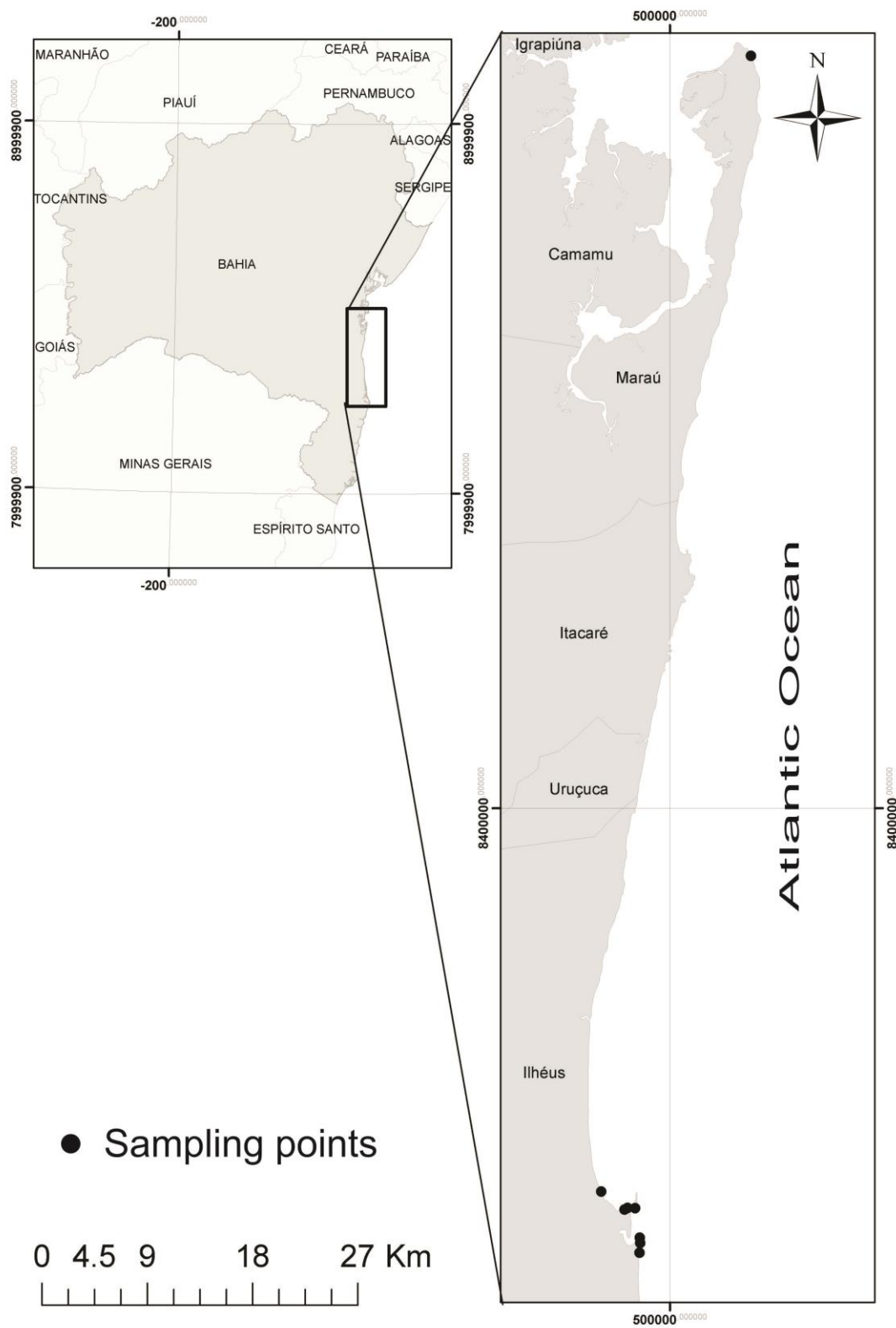


Figura 1. Mapa mostrando os pontos amostrais ao longo da Costa Sul da Bahia.

3. Resultados e Discussão

O *Imposex* foi observado em sete dos oito pontos de amostragem (Figura 2). Essa síndrome não ocorreu na St3, onde a atividade de navegação é praticamente ausente e onde há uma alta atividade hidrodinâmica, resultando assim em circulação mais forte e renovação mais frequente da água do que nos outros pontos de amostragem (Figura 2). Entre as fêmeas coletadas ($n = 178$), 30 espécimes (16,39%) exibiram *Imposex*. No entanto, apesar do baixo índice, observaram-se fêmeas estéreis tanto na St2 como na St5 (índice de sequência de deferentes de vaso = VDS = 4) (Tabela 1; Figura 2). Essas estações mostraram também o maior I% (fêmeas com alterações morfológicas sexuais). De acordo com a Barroso et al. (2002), o FPL (comprimento médio do pênis feminino), VDS, I% e porcentagem de fêmeas estéreis são geralmente os principais índices que são aplicados para avaliação da intensidade de *Imposex* em prosobrânquios.

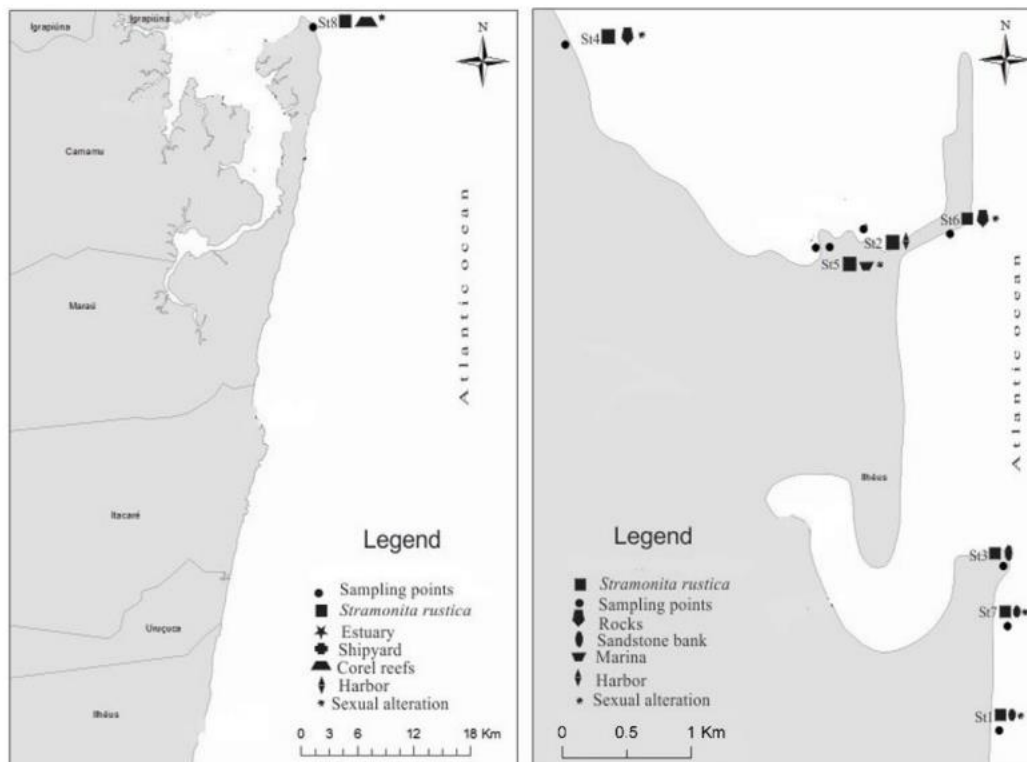


Figura 2. Pontos monitorados na Costa Sul do estado da Bahia, indicando os pontos amostrais, locais de atividade náutica e alterações sexuais.

Tabela 1. Dados de *Imposex* em *Stramonita rustica* na Costa Sul do estado da Bahia, Brasil.

Estações amostrais	Coordenadas Geográficas	F	M	Proporção sexual	Comprimento da concha	Comprimento da concha±SD	FPL (Mean ±SD) (mm)	RPL (%)	Frequência <i>Imposex</i> (%)	VDS
					±SD) (mm)	(mm)				
					F	M				
St1	14°49'2.28"S 39° 1'26.86"W	20	10	0.85	26.03±2.17	25.87±1.53	0.54± 0.26	21.35	0.17	0.4
St2	14°46'58.59" S 39° 2'1.10"W	30	30	1	24.04±1.97	26.76±3.71	0.05± 0.00	0.96	16.66	0.48*
St3	14°48'21.74" S 39° 1'25.79"W	20	10	0.5	27.65±3.74	24.34±2.01	-	-	-	-
St4	14°46'13.13" S 39° 3'16.60"W	28	32	1.14	21.68±3.65	21.54±3.66	0.54± 0.04	17.12	11.53	0.10
St5	14°47'2.93" S 39° 2'9.63"W	30	30	1	19.00±8.32	20.89±8.48	0.54± 0.00	1.88	20	0.43
St6	14°46'59.69" S 39° 1'39.24"W	18	12	0.8	27.34±1.63	26.97±1.82	0.05± 0.00	3.21	0.2	0.61
St7	14°48'36.47" S 39° 1'24.62"O	16	14	0.87	26.10±1.59	25.85±1.61	0.78± 0.81	26.0	0.6	0.93
St8	13°53'21.64" S 38°56'7.67" O	16	14	0.87	23.40±4.45	22.66±5.37	0.41± 0.54	6.76	0.5	0.8

F = fêmea; M = macho; SD = erro padrão; FPL = comprimento do pênis feminino; RPL = índice do comprimento relativo do pênis (= FPL/ média do comprimento do pênis masculino x 100); VDS = índice da sequência do vaso deferente; - = não ocorrência; * Ocorrência de fêmeas estéreis; n = 330.

De acordo com Bryan et al. (1986), o índice do comprimento relativo do pênis (RPL) pode ser utilizado para descrever a severidade do *Imposex*. Encontramos grandes diferenças entre os valores médios do RPL (comprimento relativo do pênis) em diferentes estações de amostragem (Tabela 1). As estações mais próximas dos portos e de locais com atividades de pesca e manutenção de embarcações, apresentaram os

valores RPL médios mais baixos, enquanto a estação mais afastada das atividades náuticas apresentou o valor RPL mais alto (Figura 1). Esse resultado deve ser correlacionado com diferentes variações de escala de tempo de exposição ao TBT e também à sua distribuição espacial (Smith, 1996; Barroso e Moreira, 1998; Rato et al., 2008). Os índices que tomam o comprimento do pênis como base são vistos com reservas, dada a possível relação com a maturação testicular da época do ano (Rato et al., 2008). No entanto, consideramos que os resultados RPL do nosso estudo são confiáveis, uma vez que todos os espécimes foram coletados ao mesmo tempo.

Com relação à razão sexual, os valores foram geralmente maiores para as fêmeas (Tabela 1). No entanto, os pontos de amostragem que apresentaram valores masculinos mais altos foram os mesmos que apresentaram maior frequência de *Imposex* (Figura 1) e corresponderam a áreas com grande atividade náutica, o que confirmou os resultados de outros estudos (Miller et al., 1999; Shim et al., 2002).

Embora alguns autores tenham considerado que o *Imposex* causa alterações na taxa de crescimento das fêmeas devido à maior alocação de energia (Terlizzi et al., 1999), observamos que as fêmeas eram geralmente maiores que os machos (Média = 24,07 mm, DP \pm 5,51 e 23,97 mm, SD \pm 5,52, respectivamente), mas essa diferença não foi significativa em relação ao comprimento e à estação ($p > 0,05$). Esses dados indicaram a presença não apenas de variação natural específica, mas também da baixa contaminação ambiental por TBT, como foi proposto por Vasconcelos et al. (2010). Em relação ao comprimento do pênis, encontramos uma diferença morfométrica significativa entre machos e fêmeas imposexadas, mas não houve diferença no comprimento do pênis masculino entre os pontos amostrais (Tabela 2). Isso mostrou que, ao menos neste estudo, o TBT não parece causar alterações nos machos.

Tabela 2. Resultados da análise de Kruskal-Wallis sobre o comprimento do pênis de *Stramonita rustica* entre machos e fêmeas e entre os pontos amostrais.

Variável	Fonte de variação	Graus de liberdade	W	p
Comprimento do pênis	Sexo	1	74.30966113	p<0,001
	Estações amostrais	7	93.21896858	p>0,05

W = valor do teste; p = probabilidade de erro α ($\alpha = 0.05$).

O Imposex induzido pelo TBT é irreversível, isto é, não pode ser revertido para a situação morfológica normal ou reduzido a um estágio inferior, mesmo se os gastrópodes forem posteriormente mantidos sob condições livres de TBT (Oehlmann et al., 1998). Em relação a *S. rustica*, os dados do presente estudo mostraram que houve uso generalizado de TBT no sul da Bahia. Em um estudo conduzido por Castro et al. (2007) ao longo da costa Nordeste do Brasil utilizando *S. rustica* e *S. haemastoma* como bioindicadores, verificou-se que a primeira espécie foi menos sensível do que *S. haemastoma*, ou seja, *S. rustica* apresentou valores menores de RPL e VDS nos mesmos pontos amostrais. Esses dados, junto a uma contaminação relativamente baixa de TBT em nossa área de estudo, podem explicar as baixas taxas de *Imposex* no sul da Bahia.

Ao analisar os resultados deste trabalho, é possível dizer que as frequências de *Imposex* tenderam a ser maiores em áreas com portos, atividades de manutenção de pequenos embarcações e docas. Resultados semelhantes foram observados em todo o mundo: na costa nordestina no Brasil, em *S. rustica* (Castro et al., 2007), no Mediterrâneo, em *Hexaplex trunculus* (L.) (Axiak et al., 1995) em vários portos na Europa e no porto de Halifax, no Canadá, em *Nucella lapillus* (L.) (Sousa et al., 2009).

Outros estudos também confirmaram que áreas próximas aos portos e marinas são *hotspots* para a poluição por TBT (Barroso et al., 2002; Sousa et al., 2005).

Concluindo, embora os níveis de contaminação do TBT pareçam insípidos no sul da Bahia, a reprodução de *S. rustica* foi comprometida. Isto reforça a necessidade de uma proibição total de tintas anti-incrustantes contendo TBT.

Agradecimentos

Agradecemos a Leonice Freitas, Glaucia Maciel e William Fróes pela ajuda durante as campanhas de amostragem. Agradecemos também à Dra. Mércia Costa (Universidade Federal do Espírito Santo) por compartilhar suas técnicas e conhecimentos. Este estudo foi apoiado pela FAPESB (Bahia, Brasil), sob o número de concessão TSC 0010/2011, e por meio de uma bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor.

Referências

- AXIAK, V., MICALLEF, D., MUSCAT, J., VELLA, A. and MINTOFF, B., 1995. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Marine Biology*, vol. 121, p. 685-691.
- BARROSO, CM. and MOREIRA, MH., 1998. Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. U.K: *Journal of Marine Biology Association*, vol. 78, p. 1233-1246.
- BARROSO, CM., MOREIRA, MH. and BEBIANNO, MJ., 2002. Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* (L.) from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series*, vol. 230, p. 127-135.
- BEKRI, K., SAINT-LOUIS, R. and PELLETIER, E., 2006. Determination of tributyltin and 4-hydroxybutyldibutyltin chlorides in seawater by liquid chromatography with

atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, vol. 578, p. 203-212.

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

BRYAN, GW. and GIBBS, PE., 1991. Impact of low concentration of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In: NEWMAN, MC., MCINTOSH, AW. Metal Ecotoxicology: Concepts and applications. Ann Arbor: Lewis Publishers. p. 323-361.

BRYAN, GW., GIBBS, PE., HUMMERSTONE, LG. and BURT, GR., 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of Marine Biology Association of UK*, vol. 66, p. 611-640.

CASTRO, IB., LIMA, AF., BRAGA, ARC. and ROCHA-BARREIRA, CA., 2007. Imposex in two muricid species (Mollusca: Gastropoda) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, vol. 2, p. 81-91.

CASTRO, IB., BRAGA, ARC. and ROCHA-BARREIRA, CA., 2005. Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) em áreas portuárias dos estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. *Tropical Oceanography*, vol. 33, p. 123- 131.

DEFUR, PL., CRANE, M., INGERSOLL, CG. and TATTERSFIELD, L., 1999. Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. *Society for Environmental Toxicology and Chemistry*. Pensacola, Florida.

GIBBS, PE. and BRYAN, GW., 1987. TBT paints and demise of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). *Journal of Marine Biology Association of UK*, vol. 68, p. 1482-1487.

- GIBBS, PE. and BRYAN, GW., 1994. Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod molluscs. In: KESS, J. and KRAME, M. *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. Boca Raton: CRC Press. p. 205-226.
- MILLER, KL., FERNANDES, TF. and READ, PA., 1999. The recovery of populations of dogwhelks suffering from imposex in the Firth of Forth 1987-1997/98. *Environmental Pollution*, vol. 106, p. 183-192.
- RATO, M., GASPAR, MB., TAKAHASHI, S., YANO, S., TANABE, S. and BARROSO, CM., 2008. Inshore/offshore gradients of imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 56, p. 1323-1331.
- SANTOS, DM., SANT'ANNA, BS., GODOI, AFL., TURRA, A. and MARCHI, MRR., 2011. Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. In: Ortiz, AC., Griffin NB. *Pollution Monitoring*. Hauppauge NY: N. Science Publishers. p. 31-59.
- SHIM, WJ., HONG, SH., YIM, UH., KIM, NS. and OH, JR., 2002. Horizontal and vertical distribution of butyltin compounds in sediments from shipyards in Korea. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, vol. 43, no. 3, p. 277-283.
- SMITH, BS., 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassaruis obsoletus*. *Proceedings of the Malacological Society of London*, vol. 39, p. 377-378.
- SMITH, PJ., 1996. Selective decline in imposex levels in the dogwhelk *Lepsiella scobina* following a ban on the use of TBT antifoulants in New Zealand. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 32, p. 362-365.
- SOUSA, A., LARANJEIRO, F., TAKAHASHI, S., TANABE, S. and BARROSO, CM., 2009. Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere*, vol. 77, no. 4, p. 566-573.

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

TERLIZZI, A., GERACI, S. and GIBBS, PE., 1999. Tributyltin (TBT)-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. *Italian Journal of Zoology*, vol. 66, p. 141-146.

TRIGUI EL-MENIF, N., LAHBIB, Y., LE PENNEC, M., FLOWER, R. and BOUMAIZA, M., 2006. Intensity of the imposex phenomenon impact on growth and fecundity in *Hexaplex trunculus* (Mollusca: Gastropoda) collected in Bizerta lagoon and channel (Tunisia). *Cahiers de Biologie Marine*, vol. 47, p. 1-11.

VASCONCELOS, P., MOURA, P. and GASPAR, MB., 2010. Size matters: importance of penis length variation on reproduction studies and imposex monitoring in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). *Hydrobiologia*, vol. 661, p. 363-375.

CAPÍTULO 3

EFICIÊNCIA DE ANESTÉSICOS SOBRE O GASTRÓPODE *Littoraria angulifera**

Artigo a ser submetido ao periódico: **Boletim do Instituto da Pesca**. ISSN:
0046-9939. Fator de Impacto (JCR) = 0,223

Normas da revista: Anexo III

EFICIÊNCIA DE ANESTÉSICOS SOBRE O GASTRÓPODE *Littoraria angulifera*

Gabriela Calvi ZEIDAN¹, Carlos Miguez BARROSO², Guisla BOEHS¹

- 1- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/ Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Estadual de Santa Cruz. Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus, Bahia. e-mail: gabizeidan@hotmail.com (autor para correspondência).
- 2- Universidade de Aveiro (UA), Laboratório de Ecologia Marinha e Estuarina (LEME), Departamento de Biologia, Campus Universitário de Santiago 3810-193, Aveiro, Portugal.

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito de três anestésicos em três concentrações, o Mentol ($C_{10}H_{20}O$) (1%; 1,5%; 2%), o Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) (0,5%; 1%; 1,5%) e o Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) (4%; 7%; 10%), diluídos em água destilada, sobre o gastrópode *Littoraria angulifera*. Para cada concentração foram utilizadas 20 fêmeas (total = 180), com altura da concha entre 18,3 e 26,1 mm, coletadas no mesmo local. Foram observados os tempo de indução e de recuperação do efeito sedativo, assim como a sobrevivência. Os animais foram mantidos em aquários a uma temperatura laboratorial de $25 \pm 1^\circ C$ e as observações foram feitas a cada 30 minutos após a anestesia, durante 2 horas. Após o término do experimento, estes foram mantidos nos aquários e observados por 15 dias quanto à sobrevivência. Apenas o $MgCl_2$ causou efeito sedativo sobre *L. angulifera*, sendo que a 4% e a 7% observou-se sedação de 20% e de 95% dos animais, respectivamente, após 2 horas de anestesia, enquanto que a 10%, todos os animais foram anestesiados em 1 hora. Em conclusão, *L. angulifera* pode ser anestesiada de forma eficiente em uma solução de 10% de $MgCl_2$ durante 1 h e a sua recuperação ocorre ao fim de 30 minutos sem nenhum efeito colateral evidente no comportamento e na sobrevivência.

Palavras-chave: Cloreto de Magnésio; Eugenol; Mentol; moluscos; sedação.

EFFICIENCY OF ANESTHETICS ON GASTROPOD *Littoraria angulifera*

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of three anesthetics in three concentrations, Menthol ($C_{10}H_{20}O$) (1%, 1.5%, 2%), Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) (0.5%, 1%, 1.5%) and Magnesium Chloride ($MgCl_2$) (4%, 7%, 10%) on the gastropod *Littoraria angulifera*, diluted in distilled water. Twenty females were tested for each concentration with shell height varying between 18.3 and 26.1 mm ($n = 180$), all collected from the same site. The time of induction and recovery of the sedative effect, as well as the survival rate, were assessed. The animals were kept in aquaria at a temperature of $25 \pm 1^\circ C$ and observations were made every 30 minutes since the beginning of the anesthesia for up to 2 hours. After this period, the animals were kept in aquaria and observed during the following 15 days for survival evaluation. Only $MgCl_2$ caused a sedative effect on *L. angulifera*. At 4% and 7% $MgCl_2$ solutions, 20% and 95% of animals were anesthetized after 2 hours, respectively, and at 10% all animals were anesthetized after 1 hour. In conclusion, *L. angulifera* can be efficiently anesthetized in a 10% $MgCl_2$ solution for 1 h and the recovery occurs in 30 minutes with no apparent side effects on behavior and survival.

Key words: Eugenol; Magnesium Chloride; Mentol; molluscs; sedation.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos (e.g., de fisiologia, ecologia, sistemática e ecotoxicologia) requerem análise anatômica de moluscos gastrópodes, que demandam técnicas de relaxamento para observação e manipulação dos animais, mas com preservação de suas condições morfológicas originais (MEIER-BROOK, 1976; EMBERTON, 1989). Para isso, é preciso induzir os animais ao estado de anestesia, que consiste em provocar, temporariamente, a perda parcial ou total da sua sensibilidade nervosa corporal (KAPLAN, 1969).

As características desejáveis dos agentes anestésicos, tais como a eficácia em baixas dosagens, rápida indução e recuperação do estado narcotizado, segurança aos operadores, baixo custo e facilidade na obtenção, devem estar aliadas à fisiologia da espécie e aos métodos de indução a serem empregados (MEIER-BROOK, 1976; ROSS and ROSS, 2008).

Em moluscos gastrópodes, os anestésicos mais utilizados são a benzocaína, o pentoborbital de sódio, o MS-222, o Eugenol, o Mentol e o Cloreto de Magnésio (MEIER-BROOK, 1976; GIRDLESTONE *et al.*, 1989; ARAUJO *et al.*, 1995; ACOSTA-SALMON *et al.*, 2005; BUTT *et al.*, 2008; MAMANGKEY *et al.*, 2009).

Littoraria angulifera (Lamarck, 1822) é uma espécie exclusivamente estuarina, de ocorrência neotropical anfiatlântica, ovovivípara, que ocupa diferentes estratos do mangue, desde regiões próximas à lâmina d'água até porções mais altas nos troncos do mangue, onde se alimenta principalmente de fungos e de líquens (MERKT and ELLISON, 1998). Apesar de ser observada próxima à lâmina d'água e possuir respiração branquial, é terrestre quando adulta e não resiste à submersão por muito tempo (KOHLMAYER and BEBOUT, 1986; MERKT and ELLISON, 1998; REID, 1999). Devido à sua conspícua ocorrência e facilidade de coleta, é amplamente utilizada em estudos taxonômicos, fisiológicos, ecológicos e recentemente também em monitoramentos ambientais. Até o momento, não existe um protocolo de anestesia específico para essa espécie, tendo sido utilizadas adaptações de protocolos usados em outros gastrópodes.

O Mentol (C₁₀H₂₀O) é um óleo extraído da planta menta (*Mentha arvensis* L.), conhecida também como hortelã (LORENZO *et al.*, 2002). É de fácil aquisição e de baixo custo, bem como de fácil utilização e com alta segurança ao aplicador (FAÇANHA e GOMES, 2005). Tem sido incentivado como narcótico para invertebrados em geral e para moluscos em particular (ARAUJO *et al.*, 1995).

O Eugenol (C₁₀H₁₂O₂) é um produto natural derivado do óleo de cravo (ISAACS, 1983), sendo que causa redução da ventilação das brânquias devido à depressão dos centros respiratórios medulares, resultando em hipoxia (KEENE *et al.*, 1998). É rapidamente metabolizado e excretado (WAGNER *et al.*, 2002). É igualmente de baixo custo e seguro para os animais, para o manipulador e ao meio ambiente (IVERSEN *et al.*, 2003).

O Cloreto de Magnésio (MgCl₂) é um sal anestésico não tóxico, facilmente administrado, eficiente (ACOSTA-SALMÓN and DAVIS, 2007) e largamente utilizado para indução à anestesia em diversas espécies de moluscos (BUTT *et al.*, 2008; SUQUET *et al.*, 2009). O íon magnésio é eficaz devida à sua ação bloqueadora muscular,

competindo com o cálcio requerido para a transmissão sináptica (ROSS and ROSS, 2008).

O objetivo do presente estudo foi analisar a eficiência dos três anestésicos supramencionados (Mentol, Eugenol e Cloreto de Magnésio) em *L. angulifera*, em termos de concentração, tempos de indução e de recuperação, assim como comportamento e taxa de sobrevivência após a anestesia.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento, foram coletadas, em outubro de 2016, 180 fêmeas de *L. angulifera* na Barra do Sargi-Uruçuca, Bahia (14°30'743"S; 39°02'192"W), com altura da concha entre 18,3 e 26,1 mm (Média: 22,62 ±2,06 mm) e peso (incluindo a concha) entre 0,53 e 2,53 g (Média: 1,24 ±0,43g). Após a biometria, os animais foram acondicionados em um aquário durante 15 dias a uma temperatura de 25±1°C, no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Estadual de Santa Cruz (LMM-UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil. A utilização exclusiva de fêmeas foi adotada em função do uso das mesmas como organismos sentinela para a contaminação por compostos orgânicos de estanho (ZEIDAN, 2017).

O experimento foi desenvolvido em três etapas: (a) indução, (b) recuperação e (c) comportamento/sobrevivência, seguindo instruções de LEGAT *et al.* (2015). Os anestésicos utilizados e suas respectivas marcas comerciais e concentrações foram: Mentol (Vetec Química Fina) (0,5%; 1%; 1,5%), Eugenol (Vetec Química Fina) (1%; 1,5%; 2%) e Cloreto de Magnésio (Farmax) (4%; 7%; 10%), todos diluídos em água destilada e preparados concomitantemente, totalizando nove tratamentos, com 20 exemplares cada. As concentrações foram estipuladas de acordo com estudos já realizados com outras espécies de gastrópodes (RUNHAM *et al.*, 1965; GIRDLESTONE *et al.*, 1989; ACOSTA-SALMON and DAVIS, 2007) e bivalves (ARAUJO *et al.*, 1995; ACOSTA-SALMON *et al.*, 2005; ALIPIA *et al.*, 2014).

Os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente entre os diferentes tratamentos, durante duas horas. Para o experimento de indução, os animais foram imersos nas respectivas soluções anestésicas e foi observado o efeito sedativo em intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Estes foram, então, classificados em: (I) não anestesiados, (II) parcialmente anestesiados (com abertura do opérculo, porém sensível ao estímulo mecânico) e (III) totalmente anestesiados (com abertura do opérculo, relaxamento total da parte mole e ausência de sensibilidade ao estímulo mecânico). Foi

calculada a porcentagem cumulativa de animais totalmente anestesiados (III) para cada intervalo de observação.

Após o procedimento de indução, os espécimes foram transferidos para recipientes contendo água do mar a cerca de 30 UPS (Unidades Práticas de Salinidade) para a etapa de recuperação. A duração e os tempos de observação foram os mesmos utilizados na primeira etapa (indução). Para essa etapa, foi utilizada a seguinte escala: (a) animais não anestesiados (sem resposta de relaxamento sob o efeito do anestésico), (b) parcialmente recuperados (diminuição da motilidade e fechamento do opérculo mediante estímulo mecânico) e (c) totalmente recuperados (animais que retomavam a capacidade de fechar o opérculo espontaneamente). Estes eram, então, reacondicionados em aquários de vidro, com capacidade de 5 litros, tampados com tecido (tule) para arejamento constante e contendo um pequeno reservatório de água do mar para manter a umidade, onde foram observados o comportamento e a sobrevivência por um período de 15 dias.

RESULTADOS

Apenas o Cloreto de Magnésio se mostrou eficiente como anestésico para *Littoraria angulifera*. O Mentol e o Eugenol não mostraram eficiência anestésica em nenhuma concentração testada, mesmo após as 2 horas estipuladas para o experimento. A figura 1 mostra a frequência acumulada das fêmeas anestesiadas com solução de $MgCl_2$.

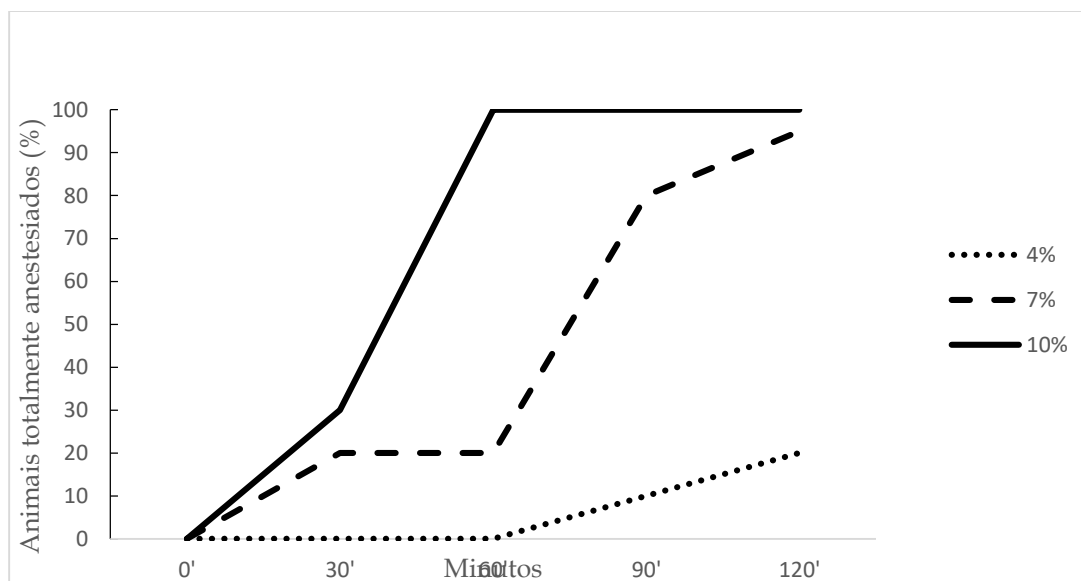


Figura 1. Porcentagem cumulativa de fêmeas de *Littoraria angulifera* totalmente anestesiadas após a exposição ao Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), às concentrações de 4%, 7% e 10%.

Conforme resumido na tabela 1, na solução de 4% de $MgCl_2$, o efeito da anestesia foi observado a partir de 90 minutos, sendo que ao final de 2 horas, 20% dos animais mostraram-se totalmente anestesiados (estágio III). Nesse mesmo intervalo de tempo, outros 60% dos animais apresentavam-se parcialmente anestesiados (estágio II) e 20% mostravam-se com comportamento normal ativo (estágio I). Nas concentrações de 7% e 10% de $MgCl_2$, a eficiência após 30 minutos de imersão foi similar, obtendo-se, respectivamente, 50% e 60% dos animais parcialmente anestesiados em ambas as concentrações, para cerca de 10 a 30% no estágio I e 20 a 30% no estágio III. A partir desse intervalo, a concentração de 10% mostrou-se mais eficiente, sendo que já com 1 hora, todos os animais estavam totalmente anestesiados. Na concentração de 7% desse anestésico, 95% dos animais estavam totalmente anestesiados somente após 2 horas de submersão.

Em relação ao tempo de recuperação (Figura 2), na concentração de 4%, 100% dos animais tiveram recuperação total em 30 minutos. A recuperação dos animais na concentração de 7% iniciou-se mais rapidamente em relação àqueles submetidos à concentração de 10%, entretanto, a recuperação neurossensorial total só foi atingida ao final de 90 minutos. À concentração de 10%, todos os animais apresentavam-se parcialmente recuperados ao final de 30 minutos e totalmente recuperados ao final de 60 minutos.

Não houve mortalidade de nenhum animal nos três experimentos nos 15 dias subsequentes à recuperação, evidenciando assim a não toxicidade dos anestésicos.

Tabela 1. Resultados, em números absolutos (indivíduos), do teste de eficiência anestésica de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) em *Littoraria angulifera* nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos nas concentrações de 4%, 7% e 10%. I - não anestesiados; II - parcialmente anestesiados; III - totalmente anestesiados; (a) animais do grupo dos não anestesiados; (b) parcialmente recuperados; (c) totalmente recuperados. n =60

		Indução							
Tempos	0'	30'	60'	90'	120'	0'	30'	60'	90'
Estágios de anestesia	I	II	III	I	II	III	I	II	III
4%	20			20			20		
7%	20			6	10	4	2	14	4
10%	20			2	12	6			20
		Recuperação							
Tempos	0'	30'	60'	90'	120'	0'	30'	60'	90'
Estágios de recuperação	a	b	c	a	b	c	a	b	C
4%	4	12	4			20			20
7%	20			4	12	4		10	10
10%	20				20				20

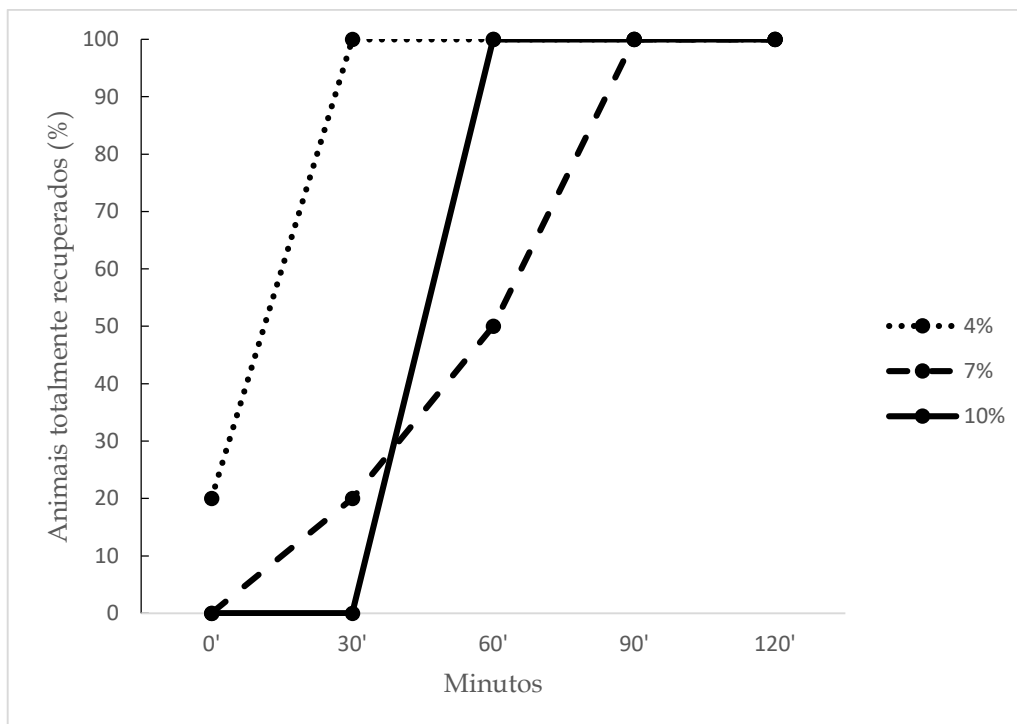


Figura 2. Porcentagem cumulativa de *Littoraria angulifera* totalmente recuperada após a exposição ao MgCl₂ em diferentes concentrações.

DISCUSSÃO

A indução ao estado de anestesia total em gastrópodes tem sido utilizada em estudos que demandam observação e manipulação de exemplares, como, por exemplo, em ensaios ecotoxicológicos (MEIER-BROOK, 1976; EMBERTON, 1989; SOUSA *et al.*, 2010). O presente experimento foi realizado com o fim de verificar o anestésico mais eficiente para um ensaio com *L. angulifera* submetida à injeção de Cloreto de Tributil-Estanho (TBT), um contaminante com potencial para o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas (ZEIDAN, 2017).

Os resultados obtidos no uso do Cloreto de Magnésio foram similares aos observados para outras espécies de gastrópodes (ACOSTA-SALMÓN *et al.*, 2005) e de bivalves (BUTT *et al.*, 2008; SUQUET *et al.*, 2009; ALIPIA *et al.*, 2014). Quanto ao Eugenol, este não se mostrou eficiente neste estudo, ao contrário do observado para outros organismos aquáticos (WAGNER *et al.*, 2002; FAÇANHA e GOMES, 2005). BILBAO *et al.* (2010), ao testarem diversos anestésicos, constataram que o Eugenol à concentração de 0,5% diluído em álcool 95%, foi eficiente para anestésiar exemplares do gastrópode *Haliotis tuberculata*, o que pode indicar que talvez a eficiência desse anestésico pode estar relacionada ao solvente utilizado (no presente estudo foi

utilizado água destilada). O Mentol também não foi eficiente, embora, conforme ARAUJO *et al.* (1995), este tem sido bastante utilizado para invertebrados em geral. Esses últimos autores avaliaram o efeito relaxante do Mentol em moluscos de água doce de diferentes gêneros e atestaram variabilidade de eficiência entre as espécies, mas a maioria apresentava relaxamento eficiente, em temperatura ambiente, apenas em um tempo de exposição longo (acima de 24 horas). Portanto, tanto o Mentol quanto o Eugenol não foram atrativos para o uso em *L. angulifera*, uma vez que esta, quando adulta, tem hábito terrestre e permanece submersa por curtos períodos (KOHLMEYER and BEBOUT, 1986), o que inviabiliza o uso de anestésicos que requerem tempo de exposição longo, como é o caso destes.

De acordo com RUNHAM *et al.* (1965), existe uma considerável variação na suscetibilidade a agentes narcóticos entre as espécies de moluscos, que envolve diversos fatores, como o estado fisiológico do animal (por exemplo, tempo de vida em aquário, estação do ano em que foi coletado), origem da água utilizada nas diluições, razão entre o volume da diluição/animal, temperatura, envelhecimento das diluições e tempo de exposição (ARAUJO *et al.*, 1995; WOODALL *et al.*, 2003). Neste estudo, todos os exemplares de *L. angulifera* foram coletados de um mesmo local, tiveram pesos e tamanhos similares e foram submetidos ao mesmo tempo de aclimatação em aquário. Adicionalmente, as soluções de anestésicos foram preparadas com três dias de antecedência de cada experimento, sendo que a temperatura, o tempo de exposição e o tipo de solvente (água destilada) também foram os mesmos e mantidos constantes durante o experimento para todas as concentrações. Esse critério foi utilizado com o fim de evitar associações do efeito dos anestésicos a outros fatores que não o próprio narcótico. O aumento do tempo de exposição aos anestésicos poderia ser letal em *L. angulifera*, por ser uma espécie que ocupa estratos mais altos em sua distribuição vertical na fase adulta (LENDERKING, 1954), assim como não permanece submersa por longos períodos (REID, 1999).

O Cloreto de Magnésio pode aumentar a salinidade das soluções contendo água do mar (ACOSTA-SALMÓN *et al.*, 2005), assim, o efeito relaxante desse anestésico pode estar relacionado mais ao choque osmótico do que ao efeito inibitório na transmissão sináptica deste (KANDEL *et al.*, 2000), o que foi também concluído por ALIPIA *et al.* (2014) para a ostra plana *Ostrea chilensis*. Para evitar a maximização da salinidade (que aumenta com a adição do Cloreto de Magnésio), foi adotada a água

destilada como solvente no presente estudo. Observou-se que o efeito desse anestésico já esteve presente em solução a 4%, porém a completa sedação de todos os animais ocorreu somente na solução de 10%. Vários autores que também fizeram uso desse anestésico para narcotizar outros gastrópodes, utilizaram concentrações entre 7% e 7,5% (BRYAN and GIBBS, 1991; BARROSO *et al.*, 2000; SOUSA *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011). A concentração de 7% foi eficiente em *L. angulifera* e semelhante quando comparada à solução mais concentrada, entretanto, levou o dobro de tempo para anestésiar todos os animais. Conforme GOMES (2001) e OSTRENSKY *et al.* (2008), quanto menor for o tempo de exposição de organismos aquáticos aos anestésicos, mais rápida é sua recuperação. Essa afirmativa pode explicar os resultados do tempo de indução e recuperação no experimento em solução mais concentrada. Dessa forma, a solução de MgCl₂ a 10% mostrou-se a mais eficiente, pois apresentou benefício aos animais devido ao período mais baixo de exposição ao anestésico, além de rápida indução e maior velocidade de recuperação da anestesia.

CONCLUSÃO

O Cloreto de Magnésio (MgCl₂) à concentração de 10% em água destilada, mostrou-se adequado para anestésiar o gastrópode *Littoraria angulifera*, tendo um efeito rápido e não interferindo na sobrevivência dos animais. Já o Mentol (C₁₀H₂₀O) e o Eugenol (C₁₀H₁₂O₂) não se mostraram eficientes nas concentrações e tempos utilizados.

AGRADECIMENTOS

À FAPESB (Bahia), pela concessão de bolsa de doutorado, assim como à CAPES pela concessão da bolsa-sanduíche na Universidade de Aveiro (Portugal) ao primeiro autor. À Glaucia Maciel pelo auxílio no desenvolvimento do experimento.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SALMON, H. and DAVIS, M. 2007 Inducing relaxation in the queen conch *Strombus gigas* (L.) for cultured pearl production. *Aquaculture*, 262(1): 73-77.
- ACOSTA-SALMON, H.; MARTINEZ-FERNANDEZ, E.; SOUTHGATE, P.C. 2005 Use of relaxants to obtain saibo tissue from the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) and the Akoya pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Aquaculture*, 246(1-4): 167-172.

- ALIPIA, T.T.; MAE, H.; DUNPHY, B.J. 2014 A non-invasive anaesthetic method for accessing the brood chamber of the Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48(3): 350-355.
- ARAUJO, R.; REMÓN, J.M.; MORENO, D.; RAMOS, M.A. 1995 Relaxing techniques for freshwater molluscs: trials for evaluation of different methods. *Malacologia*, 36(1): 29-41.
- BARROSO, C.M.; GIBBS; MOREIRA, M.H.; GIBBS, P.E. 2000 Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Marine Ecology Progress Series*, 201(1): 221-232.
- BILBAO, A.; COURTOIS DE VICOSE, G.; VIERA, M.P.; SOSA, B.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; HERNANDEZ, M.C. 2010 Efficiency of Clove Oil as Anesthetic for Abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve). *Journal of Shellfish Research*, 29(3): 679-682.
- BRYAN, G.W. and GIBBS, P.E. 1991 Impact of low concentration of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In: NEWMAN, M.C., MCINTOSH, AW. *Metal Ecotoxicology: Concepts and applications*. Ann Arbor: Lewis Publishers. p. 323-361.
- BUTT, D.; O'CONNOR, S.J.; KUCHEL, R.; O'CONNOR, W.A.; RAFTOS, D.A. 2008 Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*, 275(1-4): 342-346.
- CASTRO, I.B.; LIMA, A.F.; BRAGA, A.R.C.; ROCHA-BARREIRA, C.A. 2007 Imposex in two muricid species (Mollusca: Gastropoda) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2(1): 81-91.
- EMBERTON, K.C. 1989 Retraction/extension and measurement error in a land snail: effects on systematic characters. *Malacologia*, 31(1): 157-173.
- FAÇANHA, M.F. e GOMES, L.C. 2005 A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazônica*, 35(1): 71-75.

- GIRDLESTONE, D.; CRUICKSHANK, S.G.H.; WINLOW, W. 1989 The actions of three volatile general anaesthetics on withdrawal responses on the pond snail *Lymnaea stagnalis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology. C-Comparative Pharmacology and Toxicology*, 92(1): 39-44.
- GOMES, L.C. 2001 Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of World Aquatic Society*, Baton Rouge, 32(4): 426-431.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R.S.; ELIASSEN, R.A. 2003 The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221(1): 549-566.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. 2000 *Principles of neural science*. 4th ed. New York: McGraw-Hill. 1414p.
- KAPLAN, H.M. 1969 *Anesthesia in amphibians and reptiles*. 28 ed. Federal Proceeding. 1546p.
- KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. 1998 The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(1): 89-101.
- KOHLMEYER, J. and BEBOUT, B. 1986 On the occurrence of marine fungi in the diet of *Littorina angulifera* and observations on the behavior of the periwinkle. *Marine Ecology*, 7(4): 333-343.
- LEGAT, A.P.; J.; LEGAT, J.F.A.; GOMES, C.H.A.M.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. 2015 Anesthesia in oysters of the genus *Crassostrea* cultured in Brazil. *Boletim do Instituto da Pesca*, 41(especial): p. 785-793.
- LENDERKING, R.E. 1954 Some recent observations on the biology of *Littorina angulifera* of Biscayne and Virginia Keys, Florida. *Bulletin of Marine Science of the Gull and Caribbean*, 3(4): 272-296.

- LORENZO, D.; PAZ, D., DELLACASSA, E. 2002 Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4): 519-524.
- MAMANGKEY, N.G.F.; ACOSTA-SALMON, H.; SOUTHGATE, P.C 2009 Use of anaesthetics with the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). *Aquaculture*, 288(3-4): 280-284.
- MEIER-BROOK, C. 1976 The influence of varied relaxing and fixing conditions on anatomical characters in a *Planorbis* species. *Basteria*, 40(4-6): 101-106.
- MERKT, R.E. and ELLISON, A.M. 1998 Geographic and habitat-specific morphological variation of *Littoraria (Littorinopsis) angulifera* (Lamarck, 1822). *Malacologia*, 40(1-2): 279-295.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. 2008 *Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer*. Secretaria Especial da Aquicultura e Pesca. Brasília, 2008.
- REID, D.G. 1999 The genus *Littoraria* Griffith & Pidgeon, 1834 (Gastropoda: Littorinidae) in the tropical eastern Pacific. *Veliger*, 42(1): 21-53.
- ROSS, L.G. and ROSS, B. 2008 *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd. ed. Oxford: Blackwell Science, 236p.
- RUNHAM, N.W.; ISARANKURA, K.; SMITH, B.J. 1965 Methods for narcotizing and anaesthetizing gastropods. *Malacologia*, 2(2): 231-238.
- SANTOS, D.M.; SANT'ANNA, B.S.; GODOI, A.F.L.; TURRA, A.; MARCHI, M.R.R. 2011 Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. In: ORTIZ, A.C. and GRIFFIN, N.B. *Pollution Monitoring*. New York: N. Science Publishers. p. 31-59.
- 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(4): 566-573.

- SOUSA, A.; MENDO, S.; BARROSO, C.M. 2005 Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Applied Organometallic Chemistry*, 19 (3): 315-323.
- SOUSA, A.C.A.; BARROSO, C.M.; TANABE, S.; HORIGUCHI, T. 2010 Involvement of Retinoid X Receptor in Imposex Development in *Nucella lapillus* and *Nassarius reticulatus*-Preliminary Results. In: HAMAMURA, N.; SUZUKI, S.; MENDO, S.; BARROSO, C. M.; IWATA, H.; TANABE, S. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry: Biological Responses to Contaminants*. Tokyo: Terrapub, p. 189-196.
- SUQUET, M.; KERMOYSAN, G.; ARAYA, R.G.; QUEAU, I.; LEBRUN, L.; SOUCHU, P.; MINGANT, C. 2009 Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resource*, 22(1): 29-34.
- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. 2002 Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, 211(1): 353-366.
- WOODALL, A.J.; NARUO, H.; PRINCE, D.J.; FENG, Z.P.; WINLOW, W.; TAKASAKI, M.; SYED, N.I. 2003 Anesthetic treatment blocks synaptogenesis but not neuronal regeneration of cultured *Lymnaea* neurons. *Journal of Neurophysiology*, 90 (4): 2232-2239.
- ZEIDAN, G.C. 2017 *Efeito do tributil-estanho (TBT) sobre Stramonita rustica (Neogastropoda) e Littoraria angulifera (Mesogastropoda)*. Ilhéus (BA), Brasil. Ilhéus. 189p. (Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz). Disponível em:

CAPÍTULO 4

MORFOLOGIA, RECRUTAMENTO E COMPORTAMENTO DE *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) NA COSTA NORDESTE DO ATLÂNTICO SUL, BRASIL

Artigo a ser submetido ao periódico: **Journal of Molluscan Studies**. ISSN:1464-3766. Fator de Impacto (JCR) = 1.341

Normas da revista: Anexo II

**Morfologia, reprodução e comportamento de *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822)
na costa nordeste do Atlântico Sul, Brasil**

**Zeidan, G. C.^{1,2*}; Freitas, L. A.^{1,2}; dos Santos, G. B. M.^{1,2}; Silva-Neto, E. M.²;
Barroso, C. M.³; Boehs, G.^{1,2}**

¹ - *Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UESC), Rodovia Jorge Amado, km 16, CEP 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil;* ² - *LMM/UESC*

³ - *CESAM & Universidade de Aveiro (UA), Departamento de Biologia, Campus Universitário de Santiago 3810-193, Aveiro, Portugal*

Título resumido: Atributos de *L. angulifera*...

* Autor para correspondência:
Gabriela C. Zeidan (gabizeidan@hotmail.com)

Resumo

O gastrópode *Littoraria angulifera* está intimamente associado a estuários, sendo um potencial bioindicador. Com o intuito de fortalecer a sua indicação em monitoramentos estuarinos, foram analisados neste estudo, a morfologia, o comportamento e a reprodução dessa espécie no nordeste do Atlântico Sul (Brasil). As coletas foram feitas em duas etapas: em 2014, em 22 locais entre as latitudes 13° e 16°S do litoral do estado da Bahia, em manguezais, afloramentos rochosos naturais, atracadouros e *piers* ($n=880$) e em 2015/2016, em um manguezal nas coordenadas 14°30'743"S; 039°02'192"W ($n=3.600$). A metodologia incluiu biometria da altura da concha, sexagem, morfometria e descrição do aparelho reprodutor, assim como observações comportamentais *in loco*. A espécie é ovovivípara e apresenta dimorfismo sexual, evidenciado por um conspícuo pênis nos machos. A razão sexual macho: fêmea foi de 1,21: 1. A altura da concha mostrou-se positivamente correlacionada com o comprimento da próstata nos machos, assim como com o comprimento do oviduto palial nas fêmeas e ambos estiveram maiores em épocas de picos de recrutamento, concluindo-se que estes podem ser usados como parâmetros indicativos da reprodução nessa espécie. O menor tamanho de concha observado em animais coletados em estações com maior impacto antrópico, evidencia a plasticidade morfométrica dessa espécie frente a alterações ambientais, reafirmando seu potencial como bioindicadora.

Palavras-chave: Aparelho reprodutor, crescimento, morfologia, morfometria, recrutamento.

Introdução

As florestas de mangue (ou manguezais) dominam cerca de um quarto das costas tropicais (Spalding *et al.*, 1997) e apresentam um habitat único, o qual suporta uma fauna distinta, dominada principalmente por moluscos e por crustáceos (Macnae, 1968). Muitos dos moluscos que habitam as regiões entremarés adjacentes aos manguezais também são encontrados nesses ambientes (Cantera *et al.*, 1983). No entanto, algumas espécies em particular, mostram uma associação obrigatória com os manguezais (Plaziat, 1984), exibindo um conjunto específico de adaptações para a vida nesses locais (Vermeij, 1973; Reid, 1992).

Littoraria Gray, 1833 (Caenogastropoda: Littorinidae) é um dos poucos gêneros de gastrópodes adaptados para viver em estuários (Reid *et al.*, 1986). A morfologia de *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) foi descrita detalhadamente por Marcus e Marcus (1963), Merkt e Ellison (1998) e por Reid (1999). É uma espécie dióica, com dimorfismo sexual evidente representado pelo conspícuo pênis dos machos em todos os estágios de desenvolvimento do organismo, realiza fecundação interna, é ovovivípara e alcança a maturidade aproximadamente no segundo ano do ciclo de vida (Reid, 1999, Lenderking, 1954). Trata-se de uma espécie exclusivamente estuarina, com ocorrência na costa leste e oeste da América do Norte e do Sul (Abbott, 1974; Kohlmeyer & Bebout, 1986, Reid *et al.*, 1986; Merkt & Ellison, 1998). Os recrutas vivem sob folhas e pequenos gravetos na região do mediolitoral e, à medida que crescem e aumentam a sua produção de muco, alcança locais mais altos dos troncos e raízes do manguezal (Vermeij, 1973; Kohlmeyer e Bebout, 1986). Possui hábito detritívoro e alimentação microfágica (Gutierrez, 1988), alimentando-se principalmente de líquens e fungos (Kohlmeyer & Bebout, 1986). Devido à sua ampla distribuição e abundância, associação obrigatória com os estuários, *L. angulifera* é uma componente importante na comunidade e na ecologia desses sistemas (Reid, 1989).

Estudos sobre *L. angulifera* mostram que a espécie apresenta respostas morfológicas relacionadas ao habitat que ocupa. Merkt e Ellison (1998), ao

quantificarem a variabilidade morfológica da concha e do aparelho reprodutivo dessa espécie no Atlântico, observaram que, embora não houvesse alterações na morfologia genital relacionada à posição geográfica, variabilidade da morfologia da concha responde plasticamente às alterações nas condições ambientais, como a temperatura, radiação solar e umidade. [Melo et al. \(2012\)](#), ao estudarem *L. angulifera* na costa brasileira, constataram correlação positiva entre o tamanho da concha e a altura e área basal da árvore, indicando que os indivíduos dessa espécie respondem a diferentes micro-habitats. [Tanaka e Maia \(2006\)](#) constataram que populações que habitam áreas de manguezal perturbadas, assim como florestas de mangue de baixa altura, estão menos protegidas contra a dessecação, bem como mais propensas à competição intraespecífica. De acordo com [Melo et al. \(2012\)](#), a morfologia desta espécie está relacionada com a reserva de água em suas conchas, o que pode evidenciar diferenças no crescimento em resposta à dessecação.

O litoral do estado da Bahia apresenta mais de 1.000 km de extensão, ao longo do qual estão localizados inúmeros estuários e manguezais. O Litoral Sul, compreendido entre as latitudes 13° e 16°S, caracteriza-se por intensa atividade marítima, principalmente de pequenas embarcações relacionadas à pesca e ao turismo e pela presença de estaleiros, marinas e *piers*, além de um porto, localizado na cidade de Ilhéus ([Zeidan & Boehs, 2017](#)). A atividade pesqueira e extrativista é a principal fonte de renda para muitas famílias dessa região, sendo que pequenos cultivos de ostras são praticados no trecho nos municípios de Taperoá, Camamu e Maraú, geralmente com o apoio de instituições públicas e fomento dos governos federal e estadual ([Luz & Boehs, 2016](#)). Apesar de abranger áreas de conservação, não se tem muita informação sobre o efeito dos impactos antrópicos sobre os ecossistemas aquáticos na região. [Schiavetti et al. \(2002\)](#) atribuíram ao desenvolvimento econômico e social não ordenado a causa da maioria dos impactos e estes incluem destruição de margens de rios e estuários (incluindo os manguezais), lançamento de efluentes orgânicos não tratados e aquelas resultantes de atividade pesqueira e portuária.

O objetivo deste capítulo foi verificar as diferenças morfológicas dos caracteres sexuais entre os gêneros, a variação da altura da concha e o comportamento de *L. angulifera*, com o fim de utilizar essas informações como parâmetros para a proposição desta espécie como bioindicadora de contaminação por Tributílo-estanho (TBT) em estuários (Zeidan *et al.*, Capítulo 5, presente tese)

Material e Métodos

Área de estudo

O estudo foi realizado no litoral do estado da Bahia, nordeste do Brasil, em uma área entre os municípios de Valença, ao norte e Belmonte ao sul, numa extensão litorânea de aproximadamente 300 km, abrangendo estuários dos municípios de Belmonte, Canavieiras, Ilhéus, Uruçuca e Camamu. Além dos manguezais, essa faixa litorânea apresenta bancos de areia, florestas tropicais e zonas úmidas e esses ecossistemas estão inseridos no bioma da Mata Atlântica, conforme o Decreto Federal 750/93 (CONAMA, 1993). A vegetação predominante da região é o mangue vermelho *Rhizophora mangle* (L.) e o mangue branco *Laguncularia racemosa* (L.). O clima da região é quente e úmido, com temperatura média anual de 25°C e com precipitação pluviométrica de 2.400 a 2.500 mm ao ano (CRA, 1995). As marés são semidiurnas, com máximas e mínimas em torno de 2,2 e 0,0 m, respectivamente (DHN, 2016). Nesta região, além do Porto de Ilhéus, existem ainda diversas marinas de embarcações de pequeno e médio porte ao longo de todo o trecho, incluindo um estaleiro naval na Baía de Camamu.

Procedimentos de campo

O estudo foi conduzido em duas etapas de coletas, sendo a primeira realizada no verão de 2014 (janeiro e fevereiro), com amostragem pontual em 22 estações de coleta (=St •) entre as latitudes 13° e 16°S (Figura 1), em ambientes conservados e também com relevante impacto antrópico como portos, estaleiros e atracadouros; a segunda entre agosto de 2015 e agosto de 2016, em um local

controle (estuário do rio Sargi = Barra do Sargi, Uruçuca, Bahia; coordenadas: 14° 30'743" S; 039°02'192"W), com amostragens mensais. Todas as coletas foram feitas mediante autorização prévia para atividades com finalidade científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Brasil (Licença número 20912-3).

Na primeira etapa, foram amostrados 40 exemplares de *L. angulifera* por estação de coleta ($n=880$), que foram coletados tanto em manguezais quanto em afloramentos rochosos naturais, assim como em paredes de concreto, *piers* e atracadouros de pequenas embarcações. Na segunda etapa, foram amostrados 300 exemplares por coleta ($n= 3.900$), em diferentes alturas ao longo do manguezal, desde a franja até o supralitoral, que foram medidos e soltos no local controle, com exceção de 40 animais com altura da concha entre 13 e 22 mm, determinado pelo estágio de desenvolvimento sexual porporsto por Lenderking (1954), que eram retirados mensalmente para procedimentos laboratoriais, dos quais seis espécimes não se apresentaram com tecido íntegro para análise ($n = 514$). Durante o período de amostragem, foi observado o comportamento dos animais, tal como o posicionamento no dossel, a movimentação e o agrupamento. Nas duas etapas da pesquisa, as observações e coleta de exemplares eram realizadas em baixa-mar de sizígia, conforme consulta prévia a tábua de marés (DHN, 2014-2016). No local controle foram também medidas a temperatura e a salinidade do local a cada coleta, mediante uso de um termômetro de mercúrio padrão e de um refratômetro da marca Atago S/Mill. Na biometria para avaliações de tamanho, foi considerado o eixo principal do gastrópode (altura da concha). Para as medições, utilizou-se um paquímetro digital com 0,01 mm de precisão. A coleta dos exemplares foi feita manualmente.

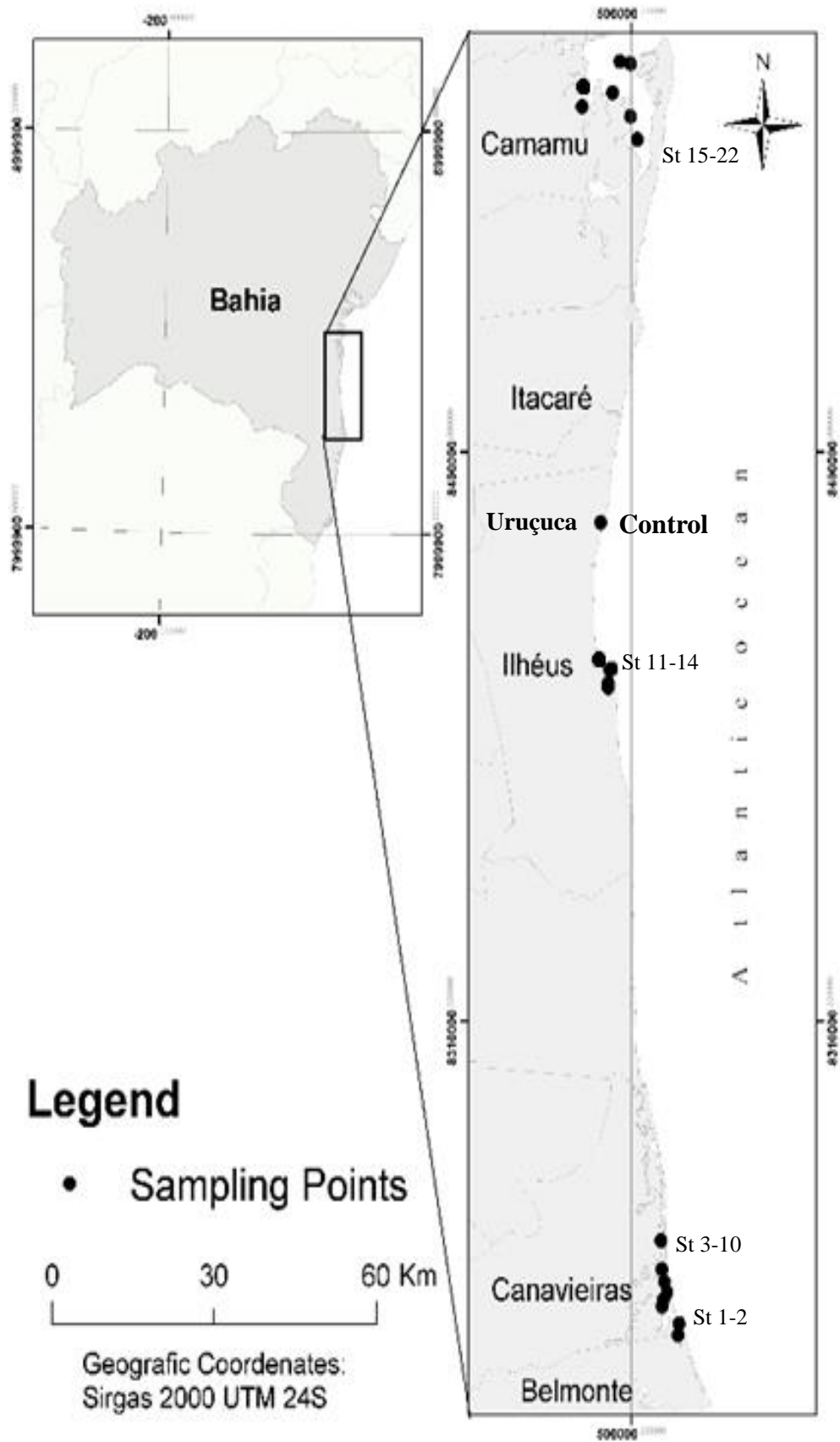


Figura 1. Estações de coleta (St=•) de coleta de *Littoraria angulifera* ao longo do litoral sul do estado da Bahia, Brasil.

Procedimentos laboratoriais

Os principais processamentos laboratoriais foram feitos no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Estadual de Santa Cruz (LMM/UESC), que foram complementados no Laboratório de Ecologia Marinha Estuarina (LEME) da Universidade de Aveiro (Portugal). Após a análise macroscópicas dos aspectos da concha como coloração, textura e espessura, os animais foram medidos quanto a altura e pesados em uma balança com 0,01 g de precisão e anestesiados com Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) a 10% em água destilada, durante 60 minutos, conforme experimento prévio (Zeidan *et al.*, Capítulo 3, presente Tese). As conchas foram quebradas com a ajuda de um torno de mesa. Os procedimentos de sexagem e descrição/biometria do aparelho reprodutor foram feitos mediante uso de um microscópio estereoscópico, em aumento total de 10x, 40x e 100x.

Nos machos, além da observação da coloração e da textura da gônada e da próstata, mediu-se o comprimento do pênis (p) e da próstata (pr) e a distância da abertura da próstata ao ânus (DPA) (**Vide figura 3B**). Nas fêmeas, observou-se a cor e a textura da gônada e do oviduto palial. Além disso, foram tomadas as medidas de distância entre o ânus e a abertura da vulva (DAV) e de comprimento do oviduto (COP) (**Vide figura 3E**). Todas as medições foram realizadas utilizando um paquímetro digital com 0,01 mm de precisão. Em ambos os gêneros, foram analisadas a morfologia, coloração e textura dos rins, lamelas branquiais e glândula digestiva.

Para uma análise mais acurada do aparelho reprodutor, foram feitas séries histológicas de 15 exemplares, incluindo machos e fêmeas. Estes, após procedimento de anestesia, tiveram a parte mole fixada em solução de Bouin

durante 24 horas e depois conservada em etanol a 70% até o início da série de desidratação em série alcoólica, diafanização em clareador de tecidos Histo-Clear® e inclusão em parafina. Cortes entre 5 e 7 µm de espessura foram obtidos por microtomia, que foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). Os tecidos foram montados em resina DPX e as lâminas foram observadas em microscópio de luz, em aumentos de 100x e 400x.

A análise morfológica macro e microscópica, tanto para machos quanto para fêmeas, foi baseada nas descrições de [Marcus e Marcus \(1963\)](#), [Merkt e Ellison \(1998\)](#) e [Reid \(1999\)](#).

Tratamento dos dados

A proporção sexual macho: fêmea (M:F) foi calculada de acordo com [Birchenough et al. \(2002\)](#). Para comparar o comprimento da concha entre locais (estações amostrais) e entre gêneros, foi aplicada análise de variância (ANOVA), complementada com o teste *a posteriori* de Tukey. Para correlacionar o peso e a altura dos animais, o comprimento da próstata, do pênis e a distância entre a próstata ao ânus ao tamanho dos machos, assim como o comprimento do oviduto e a distância da abertura da vulva ao ânus ao tamanho das fêmeas, foram aplicadas análises de correlação (Pearson e Spearman), de acordo com a normalidade dos dados. A comparação da biometria entre os gonodutos feminino e masculino foi feita a partir da aplicação do teste de Mann-Whitney (U). O nível de confiança utilizado foi 95%. As análises foram realizadas utilizando o *software* SigmaStat.

Depósito do acervo biológico

As lâminas histológicas foram depositadas no acervo histológico do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Estadual de Santa Cruz (LMM/UESC), sob a responsabilidade do primeiro e do último autor.

Resultados

Fatores abióticos

A temperatura da Barra do Sargi apresentou amplitude de 25°C a 33,2°C (Média = 28,86; DP \pm 2,66°C; N = 13) e a salinidade de 0 a 30 Unidades Práticas de Salinidade = PSU (Média = 23,11; DP \pm 10,9 PSU; N = 13), sendo que os menores valores desta última ocorreram nos meses de julho e agosto de 2016 (**Figura 2**).

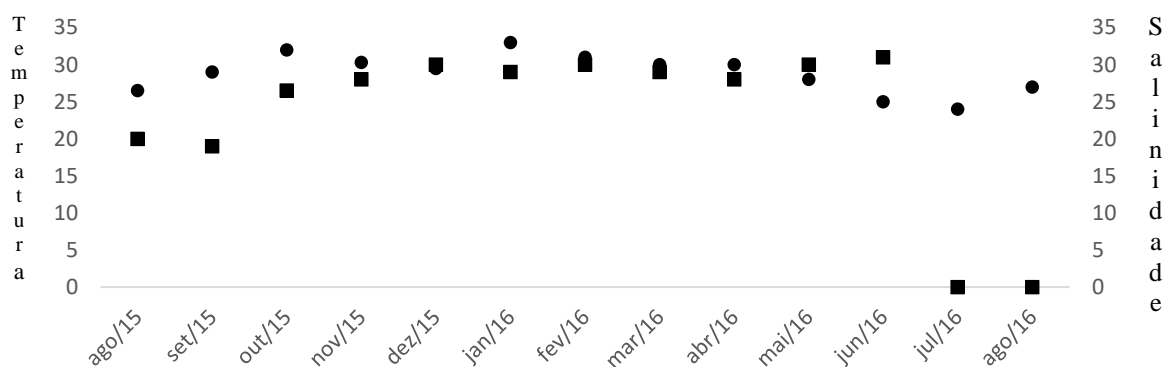


Figura 2. Valores da temperatura (°C) (•) e da salinidade (PSU: "practical salinity unit") (■) da água na Barra do Sargi, Uruçuca, Bahia, medidas mensalmente (13 meses) entre agosto de 2015 e agosto de 2016.

Morfologia

A concha de *L. angulifera* apresentou forma típica turbinada, com textura fina, porém robusta e com um vértice afiado. A coloração desta foi variável, incluindo o marrom escuro (predominante) (**Figura 3A**), o alaranjado e a cor púrpura. Os lábios da abertura da concha mostraram-se afiados e arredondados, o opérculo era córneo e de coloração marrom translúcido. A columela, convexa e comprimida na base, apresentou um padrão de coloração de creme a branca, sendo que a abertura era sempre esbranquiçada. As lamelas branquiais apresentaram-se reduzidas, formando rugas na superfície do manto em grande parte da sua extensão (**Figura 3B e 3E**). Em algumas fêmeas, logo abaixo destas,

foram observados numerosos ovos e embriões. O rim, localizado na porção anterior direita, apresentou-se nas colorações creme (predominante), amarela, verde, marrom e vermelho (**Figura 3B e 3E**). A glândula digestiva apresentou formato cônico-espiral e coloração marrom escura (**Figura 3E**); a gônada, localizada nesta, apresentou coloração branca ou amarela em ambos os sexos (**Figura 3B**).

Machos apresentaram um conspícuo pênis (**Figura 3B e 3C**), com localização atrás do tentáculo ocular direito, de coloração amarelo claro, com constituição muscular, sendo revestido externamente por um epitélio cilíndrico. Começando em sua base, o ducto peniano continua dorsalmente ao longo do pênis em todo o seu comprimento. Em um exemplar observou-se bifurcação do pênis. Nas análises microscópicas, foram observados cílios ao longo do ducto espermático até a base do pênis. O disco basal, com formato discoidal redondo e achatado, mostrou-se individualizado em relação ao pênis e mais escuro que este, sendo a base bem marcada por uma constrição (**Figura 3B**). Uma próstata grande, inchada, com coloração geralmente amarelo-alaranjada foi observada na porção lateral direita da cavidade palial, acima do músculo columelar e paralela ao ânus (**Figuras 3B e 3D**). Foi também possível observar macroscopicamente uma abertura em forma de U, a que denominamos de ducto espermático, na porção distal da próstata, localizada na cavidade palial, na região lateral no lado direito da cabeça (**Figura 3D**). Não foram observados machos afálicos.

O comprimento do pênis mediu de 1,5 a 9,98 mm (média = 5,376; DP \pm 1,470 mm; $n = 248$) e variou significativamente ($p < 0,001$) ao longo do ano, sendo que os menores e maiores valores ocorreram no início da primavera e no verão, respectivamente. O comprimento da próstata variou entre 3,67 e 11,68 mm (Média = 6,923; DP \pm 1,555 mm; $n=247$) e houve significativa variação temporal ($p < 0,001$) desse órgão, sendo que os menores valores ocorreram nos meses de agosto e abril. A distância entre a abertura da próstata ao ânus variou entre 0 e 1,3 mm (Média = 0,422; DP \pm 0,261 mm; $n=247$). Constatou-se correlação positiva entre a altura da concha e o comprimento da próstata ($r=0,499$) (**Figura**

4B) e uma baixa correlação entre a altura da concha e o comprimento do pênis ($r=0,126$) (**Figura 4A**), bem como entre o comprimento da próstata e do pênis ($p=0,005$) (**Figura 4C**).

Nas fêmeas verificou-se que os ovos são chocados na cavidade do manto, entre as lamelas branquiais, condição ovovivípara, o que foi evidenciado principalmente durante o verão (janeiro e fevereiro). Da gônada, um fino e transparente oviduto foi observado abaixo da superfície do epitélio (**Figura 3E**), contra a columela da concha. As análises macroscópicas permitiram ver que este está localizado na parte direita da cavidade do manto, sendo paralelo ao reto, levando a uma abertura vaginal (vulva) e ao oviduto palial (**Figura 3F**), localizado na porção anterior direita na cavidade do manto; tem forma cilíndrica e achatada lateralmente, coloração creme e textura lisa; possui uma única volta espiral, sendo que microscopicamente, foram observados cílios no sulco deste. A abertura anal foi observada sempre abaixo do oviduto palial (**Figura 3G**). O comprimento do oviduto palial foi de 2,37 a 9,12 mm (Média = 5,328; DP \pm 1,329 mm; $n = 267$), que apresentou variação significativa de tamanho ($p<0,001$) ao longo do ano, sendo que os menores valores ocorreram nos meses de março e abril. Houve correlação positiva significativa entre o comprimento deste e a altura da concha ($p<0,001$) (**Figura 4D**). Foi constatada uma diferença significativa ($p<0,001$) temporal na distância entre a vulva e o ânus (DVA).

Na comparação entre o comprimento da próstata e o oviduto palial, bem como entre a DPA e a DVA, constatou-se diferença significativa ($p<0,001$). A próstata apresentou geralmente o comprimento maior em relação ao oviduto palial, enquanto que a DVA foi sempre inferior a DPA, evidenciando o gonoduto masculino mais longo que o feminino em ao longo do período estudado e também a localização do oviduto palial das fêmeas no meio da cavidade do manto, onde são chocados os ovos para posterior metamorfose em larvas véliger, antes da liberação na lâmina d'água, característica reprodutiva ovovivípada.

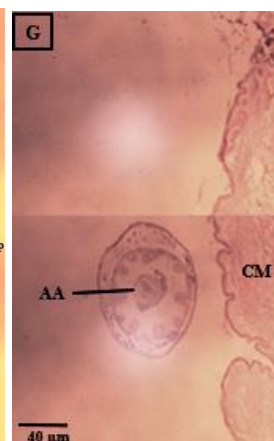
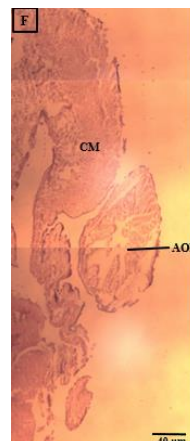
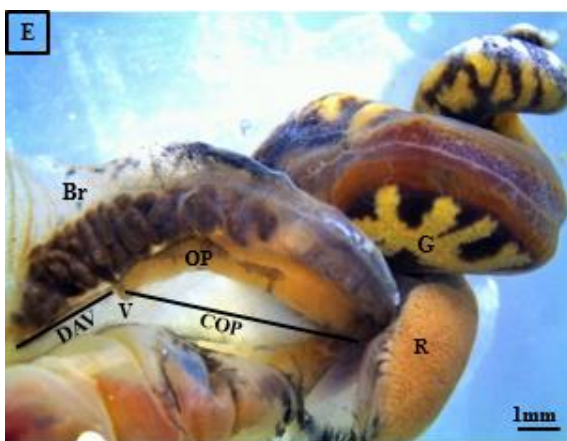
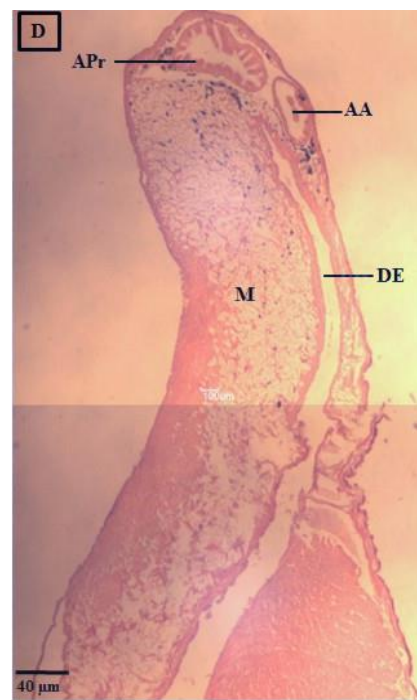
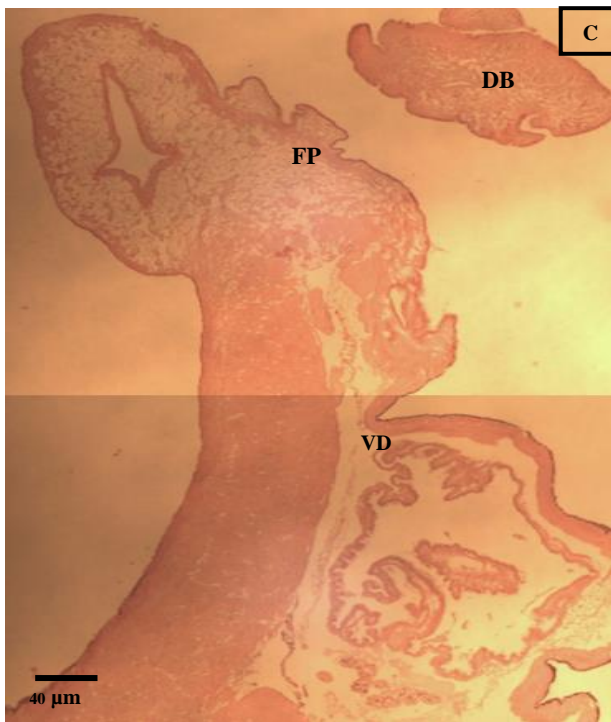
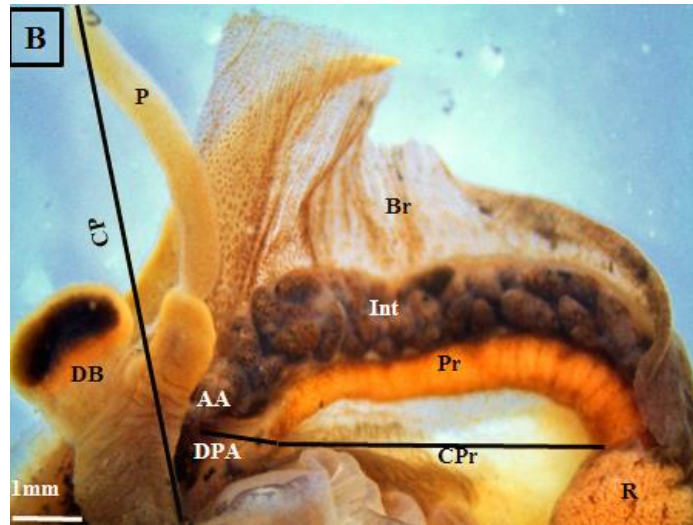


Figura 3. Morfologia de *Littoraria angulifera*. (A) Concha vista a olho nu, do lado ventral, mostrando a coloração predominante marrom com manchas escuras e uniformes. Escala: 5 mm. (B) Macho visto ao microscópio estereoscópico, evidenciando o aparelho reprodutor. (C) Sessão histológica mostrando pênis, Escala: 40 μ m. (D) Sessão histológica mostrando as aberturas da próstata e do ânus e o ducto espermático. (E) Fêmea vista ao microscópio estereoscópico, evidenciando o aparelho reprodutor. (F) Sessão histológica mostrando a abertura do oviduto palial. (G) Sessão histológica mostrando a abertura do ânus. AA = Abertura anal; AOP = Abertura do oviduto palial; Apr = Abertura da próstata; Br = Brânquias; COP = Comprimento do oviduto palial; CP = Comprimento do pênis; CPr = Comprimento da próstata; CM= Cavidade do manto; DAV = Distância do ânus à vulva; DB = Disco basal; DE= Ducto espermático; DPA = Distância da próstata ao ânus; FP = Filamento peniano; G = Gônada; GD = Glândula digestiva; M = Tecido muscular; OP = Oviduto Palial; P = Pênis; Pr = Próstata; R= Rim; VD= Vaso deferente.

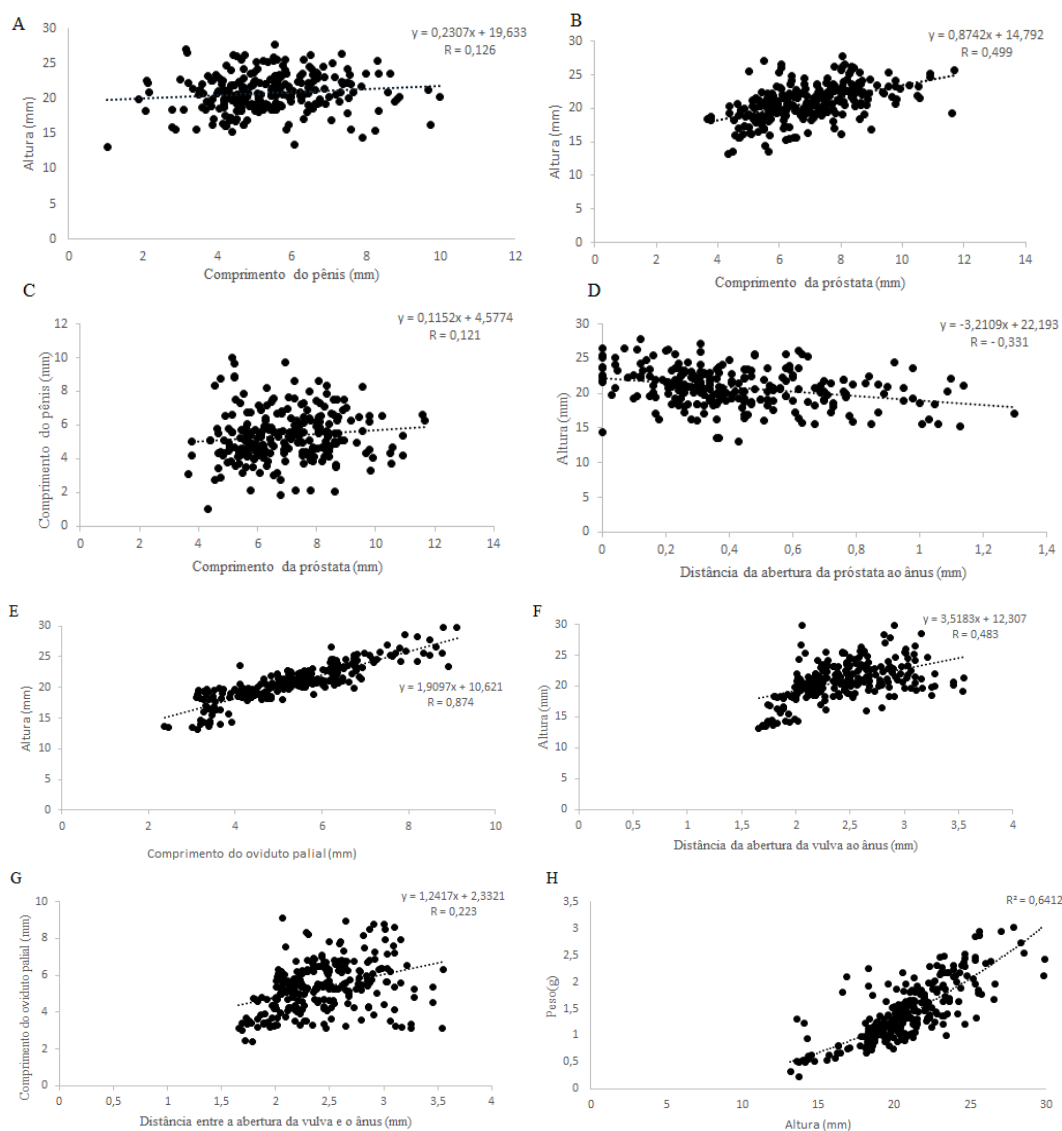


Figura 4. Resultados gráficos das correlações entre parâmetros morfométricos em *Littoraria angulifera*. A= Altura (Y) e comprimento do pênis (X); B= Altura (Y) e comprimento da próstata (X); C= Comprimento do pênis (Y) e comprimento da próstata (X); D= Altura (Y) e distância da abertura da próstata ao ânus (X); E= Altura (Y) e comprimento do oviduto palial (X); F= Altura (Y) e Distância da abertura da vulva ao ânus (X); G= Comprimento do oviduto palial (Y) e Distância da abertura da vulva ao ânus; H = Peso (Y) e altura (X).

Variação temporal dos caracteres sexuais

A análise de variância evidenciou diferenças significativas temporais dos caracteres sexuais analisados ($p < 0,01$) (**Tabela 1**) e que nas fêmeas a distância entre a abertura da vulva é continuamente maior que a distância entre a abertura da próstata ao ânus ($p < 0,01$). O comprimento do oviduto palial variou entre 2,37 e 9,12 (Média = 5,328; DP \pm 1,32) e a DAV variou de 1,66 a 3,55 (Média = 2,412; DP \pm 0,39). Nos machos o comprimento do pênis foi de 2,1 a 9,98 (Média = 5,385; DP \pm 1,460), o comprimento da próstata foi de 3,667 a 11,68 (Média = 6,929; DP \pm 1,555) e do DPA de 0 a 1,3 (Média = 0,422; DP \pm 0,261). Os testes *a posteriori* mostraram que o comprimento do oviduto palial foi significativamente maior em dezembro em relação aos meses entre março e agosto ($p < 0,01$) e a DAV em março ($p < 0,01$), em relação aos meses do período entre abril e agosto. Relativo ao comprimento do pênis, os meses de agosto, setembro e março apresentaram os maiores valores ($p < 0,01$) em conformidade com as baixas médias do comprimento do oviduto palial para estes mesmos meses. O comprimento da próstata foi diferente entre diversos meses (março, junho, julho, setembro, outubro, novembro, dezembro) ($p < 0,01$) e a DPA foi maior nos meses de inverno (junho a agosto).

Tabela 1. Resultados da ANOVA unifatorial da comparação morfométrica dos caracteres sexuais de *Littoraria angulifera* no litoral do estado da Bahia (Brasil). *F* e *H*: valores dos testes. *p*: probabilidade de erro α ; *n* = 514. CP= Comprimento da próstata; COP= Comprimento do oviduto palial; DAV = Distância entre o ânus e a vulva; DPA= Distância entre a próstata e o ânus.

Variável	Fonte de variação	Graus de liberdade	<i>F/H</i> *	<i>P</i>
COP	Meses	12	3,795	<0,001
DAV	Meses	12	54,578*	<0,001
Pênis	Meses	12	70,377*	<0,001
CP	Meses	12	72,900*	<0,001
DPA	Meses	12	101,82*	<0,001

Razão sexual

A sexagem foi facilmente determinada pelo evidente pênis nos machos. Do total de 880 espécimes coletados na primeira etapa (verão de 2014), 461 animais eram machos (M) e 419 eram fêmeas (F). A razão sexual M: F variou entre 0,29 e 2,63 entre as estações, sendo de 1,21:1 considerando o total dos animais observados, o que correspondeu a uma razão sexual M: F de 1,21: 1 (**Figura 5**).

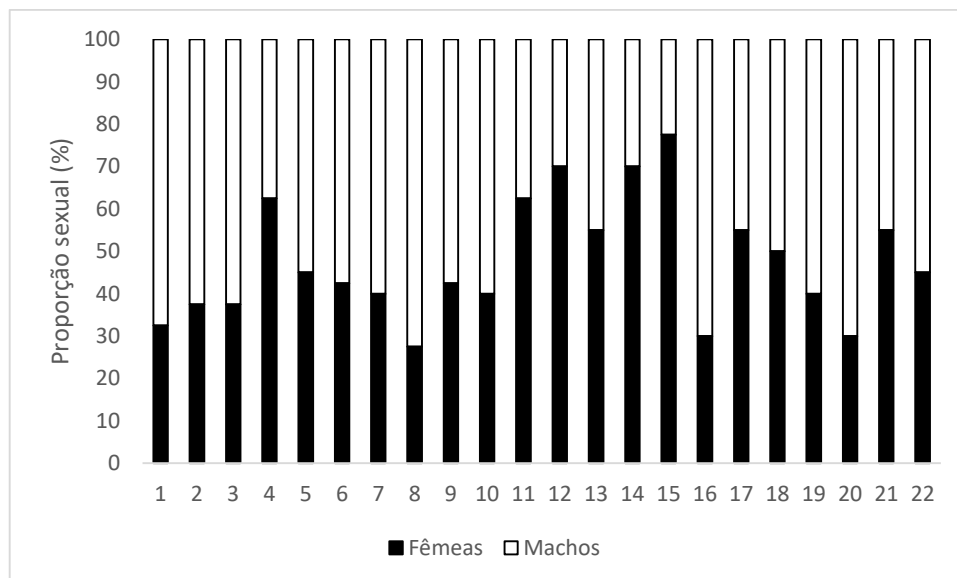


Figura 5. Proportão sexual (%) de *Littoraria angulifera* em 22 locais do litoral da Bahia, Brasil ($n = 880$).

Altura da concha/peso

A altura da concha de *L. angulifera* coletada na primeira etapa variou de 5,36 a 29,51 mm (Média = 20,942±0,735). Diferenças significativas de tamanho foram observadas entre locais, mas foram semelhantes entre os sexos (**Tabela 2**). O teste de Tukey mostrou que os animais das estações amostrais 7 (cais de Canavieiras), 11 (marina da Sapetinga, Ilhéus), 13 (cais do porto de Ilhéus) e 14 (paredão do porto do Malhado, Ilhéus), que corresponderam a locais mais antropizados e geralmente sem vegetação, eram significativamente menores ($p < 0,05$) em relação aos demais pontos amostrais.

Na Barra do Sargi (segunda fase de coletas; $n = 515$), verificou-se altura de concha de 5,36 a 31,3 mm (Média = 20,972; DP ±2,850 mm). Os animais pesaram entre 0,21 e 3,02 g (Média = 1,480; DP ± 0,552 g) (**Figura 4H**).

Tabela 2. Resultados da ANOVA unifatorial da comparação da altura da concha de *Littoraria angulifera* no litoral do estado da Bahia (Brasil), entre as estações de coleta e entre os sexos. *F*: valor do teste. *p*: probabilidade de erro α ; $n = 880$.

Variável	Fonte de variação	Graus de liberdade	<i>F</i>	<i>P</i>
Altura da concha	Estações	21	59,07042	< 0,001
	Sexo	1	1,352240	= 0,2599

Análise de distribuições de frequência de alturas de conchas

Os dados de recrutamento do presente estudo, sugere-se que *L. angulifera* apresentou reprodução contínua, com vários pequenos picos de recrutamento ao longo do ano, principalmente nos meses de temperatura mais alta, período com temperaturas um pouco mais altas do que nos dois primeiros meses de inverno (junho e julho), onde os juvenis apresentaram aumento em sua densidade (menores a 10 mm) (**Figura 6**), em conformidade com os maiores valores de comprimento do oviduto palial. As classes de tamanho mais representativas ao longo do ano foram as de 14 a 24 mm, com aumento de indivíduos entre 10 a 14 mm na primavera e no verão.

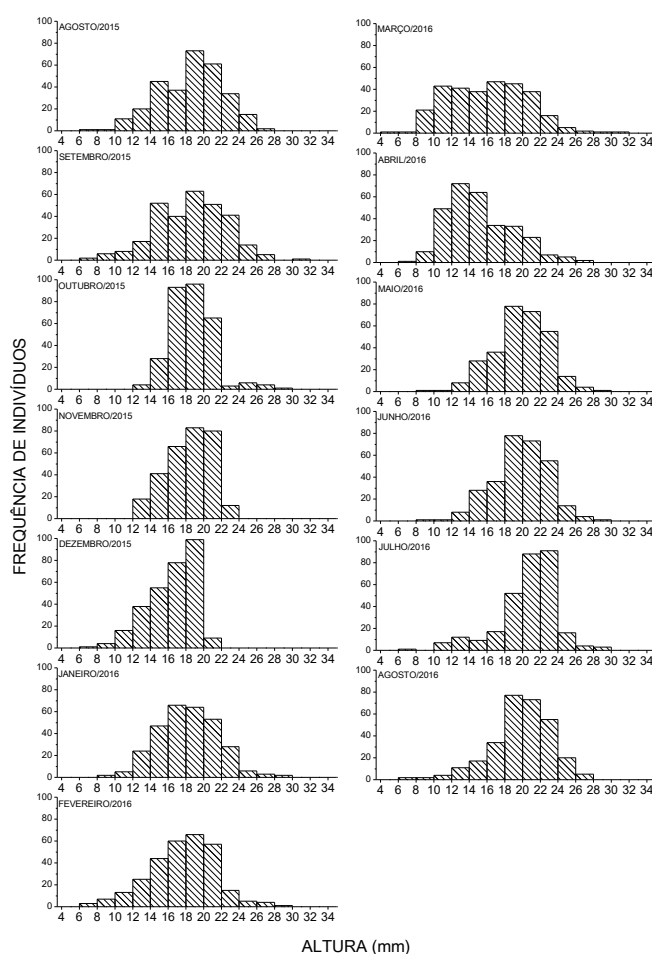


Figura 6. Frequência da altura da concha (%) de *Littoraria angulifera* de agosto de 2015 a agosto de 2016 ($n = 3.900$) na Barra do Sargi, Uruçuca, Bahia.

Aspectos comportamentais

O pico de atividade de *L. angulifera* ocorreu entre 1 e 1,5 h antes da maré alta, sendo que em períodos de céu aberto, os animais mostravam-se mais ativos, isto é, com movimentação mais rápida. Observou-se redução gradativa da movimentação dos animais durante a maré enchente e no pico da preamar estes se mostravam praticamente imóveis, agrupados nas proximidades da linha de água, sendo depois se desagregavam, ainda durante a preamar.

Nos manguezais, observou-se que durante a baixamar, os animais menores (<10 mm) eram vistos bem próximo da linha d'água, fixados a pequenos arbustos e debaixo de folhas, sempre protegidos da radiação solar, enquanto que os maiores eram encontrados com maior abundância no supralitoral, sempre fixados a troncos e raízes do mangue. Alguns exemplares, quase sempre fêmeas, foram vistos em contato direto com o sedimento e a água, comportamento que sugere ovipostura. Já nos demais ambientes (afloramentos rochosos, paredes de concreto), não foi observado esse comportamento, mas os animais, independentemente de tamanho, agrupavam-se em locais mais altos durante a maré cheia.

Discussão

A morfologia da concha de *Littoraria angulifera* observada neste estudo foi semelhante à encontrada em outras populações de regiões eutróficas da costa leste do Atlântico por [Merkt e Ellison \(1998\)](#). Esses autores atestaram que a variabilidade morfológica constatada entre diferentes populações do Atlântico leste e oeste, resulta primariamente de respostas a condições ambientais dos locais de sua ocorrência. No que se refere à coloração da concha, no litoral da Bahia, observou-se predomínio de indivíduos com concha marrom. É possível que a grande quantidade de matéria orgânica que geralmente ocorre nos manguezais brasileiros ([Schaeffer-Novelli et al., 1990](#)), incluindo os desta região, seja a responsável por essa coloração. De acordo com [Cook e Freeman \(1986\)](#) e [Reid \(1987\)](#), o polimorfismo das cores da concha nessa espécie está relacionado com as condições ambientais e também nutricionais de cada local.

A razão sexual observada neste estudo, com uma leve tendência de predomínio de machos, pode ter sido influenciada pela posição vertical que os animais ocupam no substrato consolidado, o que foi evidenciado principalmente nas árvores do mangue. Os indivíduos fixados em locais mais altos (geralmente acima de um metro a partir do substrato) foram mais facilmente visualizados e conseqüentemente, mais facilmente coletados, tratando-se provavelmente de machos em sua maioria. Em experimento realizado por [Lenderking \(1954\)](#), em que 30 a 70 indivíduos de *L. angulifera* eram colocados submersos em recipientes contendo água do mar, 80% dos espécimes que alcançavam o topo dos recipientes eram do sexo masculino, o que estaria relacionado ao fato de as fêmeas se posicionarem geralmente próximo ao substrato para realizarem a postura, e esse comportamento pode explicar a proporção sexual obtida no presente estudo. Ainda segundo esse autor, por ser ovovivípara, as fêmeas dessa espécie precisam liberar suas larvas diretamente na lâmina d'água e para isso precisam estar parcial ou totalmente submersas.

Estudos com litorinídeos feitos por [Vermeij \(1973\)](#) e por [Kohlmeyer e Bebout \(1986\)](#) sugerem que a zonação está também relacionada ao tamanho do animal, o que foi corroborado neste estudo. Segundo esses autores, os animais maiores, por apresentarem maior produção de muco, podem ocupar áreas mais distantes do corpo d'água, sem correrem o risco de dessecação. Já os indivíduos menores (e ainda com produção de muco insuficiente), ficariam restritos a áreas mais alagadas e próximas à linha d'água, onde estes não correm um risco grande de dessecação durante os períodos de baixamar. [Melo et al. \(2012\)](#) constataram ausência de zonação de *L. angulifera* no litoral do estado Ceará (nordeste do Brasil), o que foi atribuído pelos autores a um grande número de canais de água ao longo do bosque de mangue, fato que teria causado redução no estresse dessecativo e conseqüentemente distribuição mais homogênea da população no local.

O fato de termos encontrado animais menores nas populações de áreas mais impactadas reforça a plasticidade morfológica da espécie enfatizada por

Merkt e Ellison (1998), assim como o seu potencial como bioindicadora. Fato similar foi observado para a espécie congênica *L. scabra* por De Wolf e Rashid (2008) e por Costa *et al.* (2013) em áreas poluídas próximas ao Porto de Vitória, Espírito Santo, sudeste do Brasil. Estes e os nossos resultados estão também em conformidade com os encontrados para *L. angulifera* por Tanaka e Maia (2006) e por Melo *et al.* (2012) em outros locais do Nordeste brasileiro, assim como por Costa *et al.* (2013) no Sudeste brasileiro. Além da poluição, animais de manguezais impactados (onde a vegetação do mangue foi geralmente mais baixa e esparsa) e que ocupam substratos artificiais, têm certamente o seu estresse fisiológico aumentado, em função da dessecação ocasionada pela depleção de umidade ocasionada, nesse caso, pela incidência direta de radiação solar. Segundo Merkt e Ellison (1998) e Melo *et al.* (2012), a dessecação acarreta, além de redução no crescimento, diminuição na densidade populacional e aumento de mortalidade.

O estudo mostrou ampla conformidade com as descrições do aparelho reprodutor feitas anteriormente em *L. angulifera* por Marcus e Marcus (1963), Merkt e Ellison (1998) e por Reid (1999). O aparelho reprodutor masculino do gênero *Littoraria* assemelha-se ao do gênero *Littorina*, descrito por Linke (1933) e por Fretter e Graham (1962). Em *L. angulifera*, os lóbulos de testículo ramificam-se na glândula digestiva e se unem para formar um ducto, que corre próximo à superfície da massa visceral contra a columela, sendo que a porção mais distal e retorcida do ducto é distendida com o estoque de esperma armazenado durante a época de reprodução, funcionando como uma vesícula seminal e que leva ao vaso deferente palial via uma pequena porção renal (Marcus e Marcus, 1963). Marcus e Marcus (1963) observaram que nas espécies do gênero *Littoraria*, a glândula de próstata é fechada, em contraste com a próstata aberta apontada por Reid (1999) em grande número de espécies de litorinídeos. Esses autores observaram que em *L. angulifera*, a próstata se abre num sulco ciliado, que leva o esperma a um conspícuo pênis, situado no lado direito da cabeça, atrás do olho, o que foi confirmado neste estudo. De acordo com Reid (1999), a forma do pênis apresenta grande variação entre os gêneros da

família Littorinidae, sendo, por esse motivo, de grande importância taxonômica nesse grupo. Segundo este, nas espécies do gênero *Littoraria*, este é diferenciado pelo filamento peniano e pela base, sendo que glândulas penianas são ausentes, o disco glandular penial é bem desenvolvido e o ducto espermático geralmente, mas não sempre, é aberto. Ainda segundo Reid (1999), em *L. angulifera*, a base é bifurcada, sendo geralmente de grande tamanho, mesmo relaxada e o disco glandular penial é arredondado e achatado, tem cor marrom e é composto por tecido glandular.

No presente estudo constatou-se uma (fraca) correlação positiva entre o tamanho do pênis e o comprimento do animal, o que não foi observado por Merkt e Ellison (1998), que constataram invariância nesse aspecto. Conforme Reid (1999), como esse órgão é bem desenvolvido em litorinídeos já na fase juvenil, o tamanho deste não indica maturidade sexual. O tamanho do pênis apresentou-se maior nos meses que o oviduto palial foi mais baixo, quando comparados aos meses de verão, sugerindo assim comportamento reprodutivo. Já o comprimento da próstata (órgão responsável pela nutrição e transporte dos espermatozoides) mostrou, no presente estudo, não somente correlação positiva com o comprimento de concha, mas também com os períodos de maior número de recrutas da população e, por esse, motivo sugerimos que esse parâmetro morfométrico possa ser utilizado para avaliação do ciclo reprodutivo nessa espécie.

Com relação à morfologia do aparelho reprodutor das fêmeas, diferentemente do observado nas espécies ovíparas congênicas, em que o oviduto palial possui de quatro a seis voltas (que contém diversas glândulas responsáveis pelo encapsulamento dos ovos), *L. angulifera* tem apenas uma volta simples, sem glândulas de encapsulamento, assemelhando-se às espécies do subgênero *Littorinopsis* e refletindo claramente a ovoviviparidade. Os ovos são chocados entre as lamelas branquiais na cavidade do manto e posteriormente são liberados na lâmina d'água (Marcus & Marcus, 1963; Reid, 1999). Conforme Reid (1999), o oviduto de espécies do gênero *Littoraria* é um tubo achatado

lateralmente, levando a um saco cego, a *bursa copulatrix* (bolsa copulatória), por sua vez situada próxima à abertura anterior, que se une próximo à abertura da cavidade do manto. Segundo [Fretter e Graham \(1994\)](#), durante a copulação, o esperma é depositado nessa bolsa e é provavelmente nesse momento que a fertilização acontece. [Merkt e Ellison \(1998\)](#), ao estudarem populações anfi-atlânticas, concluíram que estas possuem uniformidade na forma genital e no tamanho desse órgão. No presente estudo, foi verificada uma correlação positiva entre o tamanho das fêmeas e o comprimento desse órgão, o que presume também correlação positiva com a fecundidade. Nesse aspecto, [Merkt e Ellison \(1998\)](#) interpretaram que fêmeas maiores podem ter ninhadas maiores, já que possuem maior espaço para armazenar e chocar os ovos na cavidade do manto. No presente estudo foram observados ovidutos maiores em épocas de maior número de recrutas, o que foi provavelmente ditado por fêmeas adultas e maiores e tal fato corrobora a importância do uso da morfometria desse órgão na avaliação do ciclo reprodutivo de populações dessa espécie.

Em um estudo realizado por [Borkowski \(1971\)](#), com cinco espécies de litorinídeos, a gametogênese e a liberação de gametas ocorreram durante todo o ano, com desova mais acentuada nos meses mais quentes, assim como foi observado neste estudo com *L. angulifera* relativo ao recrutamento e os juvenis presentes em todos meses, com aumento do seu número em períodos mais quentes. De acordo com [Lenderking \(1954\)](#), a taxa de crescimento de recrutas de *L. angulifera* na Flórida é de 93% ao ano, o que significa que indivíduos de 10 mm teriam aproximadamente um ano de idade. A partir dessa classe de tamanho, a taxa de crescimento dos animais começaria a diminuir, o que foi também observado para *L. flava*, a espécie congênica filogeneticamente mais próxima de *L. angulifera* ([Marcus & Marcus, 1963](#); [Reid, 1999](#)). Ainda segundo [Lenderking \(1954\)](#), a primeira desova ocorre no segundo ano do ciclo de vida da espécie, quando os animais têm aproximadamente 15 mm de comprimento. No presente estudo foi constatado um rápido crescimento de *L. angulifera*, o que está muito provavelmente relacionado às altas temperaturas do ano todo, típicas de regiões tropicais, mas outros fatores devem ser considerados. Conforme [Merkt e](#)

Ellison (1998), populações de regiões oligotróficas apresentaram crescimento mais lento quando comparadas às de regiões eutróficas, em função da menor disponibilidade de alimento. Esses autores ainda verificaram uma correlação negativa entre o crescimento e a salinidade nessa espécie, o que também explica o rápido crescimento na população da Barra do Sargi, onde a salinidade média foi de 23 PSU no período. Além disso, o baixo impacto antrópico desse local, que apresentou manguezal íntegro, com vegetação alta e bom sombreamento, pode ser um fator coadjuvante ao bom desenvolvimento dessa população.

Os estuários são sistemas altamente complexos, dinâmicos e são influenciados por uma variedade de estressores, naturais e antropogênicos, que podem afetar a saúde e a estabilidade desses sistemas (O'Connor, 1996; Telesh, 2004). Dados atuais mostram que nos últimos 15 anos, o Brasil perdeu mais de 20% de sua área de manguezais como resultado de atividades antrópicas (SOS Mata Atlântica, 2017). Os organismos refletem a integridade ecológica total dos ecossistemas (física, química e biológica), integrando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo uma medida agregada dos impactos (Barbour et al., 1999). Segundo Mccarty e Munkittrick (1996), bioindicadores são organismos que respondem a estressores antropogênicos por meio de reações e/ou alterações genéticas, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, ecológicas ou comportamentais, que indiquem ou reflitam a qualidade do ambiente. Neste estudo, foi observado que em ambientes de maior impacto antrópico como portos e estaleiros, os animais foram significativamente menores que nas demais estações mais conservadas. Isso revela que as atividades antropogênicas afetam diretamente o comportamento e a morfologia dessa espécie. Como trata-se de uma espécie exclusivamente estuarina, esses resultados refletem, em parte, a sanidade desses ambientes. Segundo Melo et al. (2012), *L. angulifera* pode funcionar como bioindicador, uma vez que responde plasticamente a perturbações ambientais como o desmatamento, refletindo na densidade populacional e no comprimento do animais.

Em conclusão, este estudo mostrou que os caracteres sexuais de *L. angulifera* apresentaram diferenças morfométricas sexuais e temporais. Os dados de morfometria, em conjunto com a análise de recrutamento, sugerem a reprodução contínua da espécie. Corroborou também aspectos da morfologia reprodutiva da espécie, como a característica ovovivípara e confirmou o uso da morfometria do oviduto e da próstata como parâmetros para estudos de eventos reprodutivos na espécie. Mostrou ainda o comportamento de zonação, que é influenciado pela postura, tamanho dos animais e pelo estresse fisiológico produzido pela dessecação. E por fim, confirmou a diferença na altura das conchas dos animais, influenciada pela antropização, reafirmando o uso da espécie como bioindicadora.

Agradecimentos

À Susana Galante e Ana Hilário, do LEME/UE (Portugal), pelo auxílio no processamento histotécnico. Ao Dr. David G. Reid, do Museu de História Natural de Londres, pela contribuição na interpretação da biologia da espécie e disponibilização de material bibliográfico. À FAPESB (Bahia, Brasil), pelo fomento do estudo através do projeto número TSC 0010/2011. Igualmente à FAPESB pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor, que também agradece à CAPES (Brasil) pela concessão da bolsa sanduiche (PDSE) em Aveiro, Portugal.

Referências

ABBOTT, R.T. 1974. *American Seashells*. Van Nostrand Reinhold, New York. 633pp.

BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D.; STRIBLING, J.B. 1999. *Rapid bioassessment Protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*. (2ed) EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.

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

BORKOWSKY, T.V. 1971. Reproduction and reproductive periodicities of south Floridian Littorinidae (Gastropoda: Prosobranchia). *Bulletin of Marine Science*, **21**: 826-840.

CANTERA, J.; PATRICK, M.A. & BERNARD, A.T. 1983. Biogeographic and Ecological remarks on molluscan distribution in mangrove biotopes. *Gastropods Journal of Molluscs Studies*, **49**: 10-26.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brazil. 1993. Resolution Number 10, of October 1, 1993. Diário Oficial da União (DOU) 209, p. 16497-16498.

COOK, L.M. & FREEMAN, P.M. 1986. Heating properties of morphs of the mangrove snail *Littoraria pallescens*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **29**: 295-300.

COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B. & TOGNELLA, M.M.P. 2013. Assessing the continuous impact of Tributyltin from Antifouling Paints in a Brazilian mangrove area using Intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. *International Journal of Oceanography*, **2013**: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/769415>

CRA - Conselho Regional de Administração da Bahia. 1995. *Publicações e Acervos 1995*. Salvador (BA).

DE WOLF, H.; RASHID, R. 1987. Heavy metal accumulation in *Littoraria scabra* along polluted and pristine mangrove areas of Tanzania. *Environmental Pollution*, **152**: 636-643. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.064>

DHN - Diretoria de Hidrografia e Navegação. Marinha do Brasil. Tábuas de marés de 2014 a 2016. Available in: <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/>

FRETTER, V. & GRAHAM, A. 1994. *British prosobranch molluscs. Their Functional Anatomy and Ecology*. Revised and updated edition, v. 161.

GUTIERREZ, P.C. 1988. The ecology and behavior of the mangrove periwinkle, *Littoraria angulifera*. *Biotropica*, **20**: 352-356.

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

LENDERKING, R.E. 1954. Some recent observations on the biology of *Littorina angulifera* Lam. of Biscayne and Virginia Keys, Florida. *Bulletin of Marine Science of the Gull and Caribbean*, **3**: 273-295.

LINKE, O. 1933. Morphologie and Physiologie des Genitalapparatus der Nordseelittorinen. *Helgoland Wiss. Meeresunters*, **19**: 1-60.

LUZ, M.S.A. & BOEHS, G. 2016. *Perkinsus beihaiensis* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **53**: p. 192.

MACNAE, W. 1968. A General account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the Indo-West-Pacific region. *Advances in Marine Biology*, **6**: 73-270.

MARCUS, E. & MARCUS, E. 1963. Mesogastropoden von der Küste São Paulos. *Akademie der Wissenschaften: Abhandlungen der math.-naturw. Klasse*, **1**: 1-105.

MELO, C.G.B.; MAIA, R.C.; ROCHA-BARREIRA, C.A. 2012. Shell morphology variation and population density of *Littoraria angulifera* (Mollusca: Gastropoda) in mangrove forests of Ceará State, Brazil. *Arquivo de Ciências Marinhas*, **45**: 68-76.

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

MCCARTY, L.S. & MUNKITTRICK, K.R. 1996. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Human Ecology Risk Assessment*, **2**:268–274.

O'CONNOR, R.J. 1996. Toward the incorporation of spatiotemporal dynamics into ecotoxicology. In: *Population dynamics in ecological space and time* (Rhodes, O.E.; Chesser, R.K.; Smith, M.H., eds), University of Chicago Press, Chicago: 281-317.

PLAZIAT, J.C. 1984. Mollusk distribution in the mangal. In: *Hydrobiology of the mangal* (Por, F.D. & Por, I., eds.). The Hague: 111-143.

REID, D.G. 1986. *The Littorinid Molluscs of Mangrove Forests in the Indo-Pacific Region*. British Museum (Natural History), London.

REID, D.G. 1987. Natural selection for apostasy and crypsis acting on the shell colour polymorphism of a mangrove snail, *Littoraria filosa* (Sowerby) (Gastropoda: Littorinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **30**: 1-24.

REID, D.G. 1989. The comparative morphology, phylogeny, and evolution of the gastropod family Littorinidae. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **26**: 39-68.

REID, D.G. 1992. Predation by crabs on *Littoraria* species (Littorinidae) in a Queensland mangrove forest. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Littorinid Biology* (Grahame, J.P.J.; Mill, P.J. & Reid, D.G., eds), Malacological Society of London: 141-151.

REID, D.G. 1999. The genus *Littoraria* Griffith & Pidgeon, 1834 (Gastropoda: Littorinidae) in the tropical eastern Pacific. *Veliger*, **42**: 21-53.

ROSEWATER, J.; VERMEIJ, G.J. 1972. The amphi-Atlantic distribution of *Littorina meleagris*. *The Nautilus*, **86**: 67-69.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; CAMARGO, T.M. 1990. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. *Estuaries*, **13**: 204-218.

SCHIAVETTI, A.; SCHILLING, A.C.; DE OLIVEIRA, H.T. 2002. Caracterização sócio-ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Cachoeira, Sul da Bahia, Brasil. In: *Conceitos de Bacias Hidrográficas: teoria e aplicações* (Schiavetti, A. & Camargo, A.F.M., eds.), pp. 289. Editus, Ilhéus.

SPALDING, M.D.; BLASCO, F. & FIELD, D. *World Mangrove Atlas*. Okinawa, Japan. International Society for Mangrove Ecosystems. 178pp.

SOS MATA ATLÂNTICA. *Brasil perde 20% de seus manguezais em 15 anos, mas Mata Atlântica começa a regenerar.* Available in: <https://www.sosma.org.br/106147/brasil-perde-20-de-seus-mangues-em-15-anos-mas-mata-atlantica-comeca-regenerar>. Accessed in: June, 8, 2017.

TANAKA, M.O. & MAIA, R.C. 2006. Shell morphological variation of *Littoraria angulifera* among and within mangroves in NE Brazil. *Hydrobiologia*, **559**:193-202.

TELESH, I.V. 2004. Plankton of the Baltic estuarine ecosystems with emphasis on Neva Estuary: a review of present knowledge and research perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, **49**: 206-219.

VERMEIJ, G.J. 1973. Molluscs in mangrove swamps: physiognomy, diversity, and regional differences. *Systematic Zoology*, **22**: 609-624.

ZEIDAN, G.C. & BOEHS, G. 2017. Assessment of tributyltin contamination based on imposex in *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) along southern Bahia coast, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **77**: 185-190.

CAPÍTULO 5

UTILIZAÇÃO DE *Littoraria angulifera* (GASTROPODA) COMO ORGANISMO-TESTE PARA A CONTAMINAÇÃO PELO ORGANOESTÂNICO TRIBUTIL-ESTANHO (TBT)

Utilização do *Littoraria angulifera* (Gastropoda) como organismo-teste para a contaminação pelo organoestânico tributil-estanho (TBT)

Zeidan, G. C.^{1*}; Barroso, C. M.²; Boehs, G.¹

¹ - Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Rodovia Jorge Amado, km 16, CEP 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil;

² - 1- CESAM & Universidade de Aveiro (UA), Departamento de Biologia, Campus Universitário de Santiago 3810-193, Aveiro, Portugal

*Autor para correspondência (gabizeidan@hotmail.com)

Título resumido: *Littoraria angulifera* em ensaio sobre TBT...

Resumo

O Tributil-estanho (TBT), utilizado em tintas anti-incrustantes em embarcações, é um severo contaminante em regiões costeiras. Embora mundialmente coibido desde 2008, o mesmo continua sendo utilizado em alguns países. Em moluscos gastrópodes, o TBT causa alterações sexuais. Por esse motivo, várias espécies desse grupo são utilizadas como bioindicadoras da presença dessa substância. Este estudo avaliou a sensibilidade do gastrópode *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822), de ocorrência estritamente estuarina, à contaminação pelo TBT através de ensaios. Para isso, 646 fêmeas foram analisadas em locais potenciais de contaminação, como estaleiros, atracadouros e marinas, além de um local controle, no sul da Bahia, nordeste do Brasil, sendo que destes 564 animais foram utilizados em dois ensaios, com uso de distintas concentrações de TBT, sendo um via dieta de papel A4 (n=384) e o outro através de injeções intramusculares (n=180). Os indivíduos expostos ao TBT (ambiente e ensaios) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na morfometria do trato sexual (comprimento do oviduto palial e distância entre o ânus e a vulva) em relação aos animais do controle (ambiental e laboratorial), indicando alteração sexual. Com esses resultados, recomendamos o uso dessa espécie em monitoramentos estuarinos, ambientes onde outros conhecidos bioindicadores de TBT estão ausentes.

Palavras-chave: Alteração sexual; bioindicadores; compostos orgânicos de estanho; ensaios; estuários; morfometria, oviduto palial

Introdução

Devida a alta complexidade, dinamismo e diversidade ecossistêmica do ambiente aquático, estressores naturais e em muitos casos antropogênicos podem afetar a saúde e estabilidade desses sistemas (RAND et al., 1995, O'CONNOR, 1996; TELESH, 2004). Atividades náuticas como portos, marinas, atracadouros, docas e estaleiros estão geralmente situadas em regiões estuarinas e são potenciais fonte de poluentes, como o tributil-estanho (TBT), composto orgânico de estanho (COE) utilizado em tintas anti-incrustantes de embarcações e que, apesar do banimento mundial em 2008, é ainda um importante contaminante de estuários e de outros sistemas costeiros (GOLDBERG, 1986; STEWART et al., 1992).

Uma vez presente na coluna de água, o TBT tende também a depositar-se e acumular-se no sedimento superficial, onde pode permanecer por anos, tornando-se biodisponível e facilmente acumulativo para os organismos aquáticos (MAGUIRE, 1996; ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Por conseguinte, é necessário compreender o destino e os efeitos deste contaminante em animais aquáticos, especialmente naqueles de regiões costeiras que estão mais ameaçados pela poluição gerada pela atividade portuária e de reparação naval (OBERDORSTER & GREEN, 2002).

Organismos que respondem a estressores antropogênicos por meio de reações e/ou alterações genéticas, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, ecológicas ou comportamentais, que indiquem ou reflitam a qualidade do ambiente, são chamadas de bioindicadores (McCARTY & MUNKITTRICK, 1996). Os moluscos são os modelos mais amplamente utilizados em testes ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade do TBT. Estes são bioindicadores utilizados em programas de monitoramento da poluição por TBT no ambiente marinho, pois são abundantes e fáceis de coletar, apresentam elevados fatores de bioacumulação (LANGSTON & POPE, 2009) e são os modelos mais sensíveis a este poluente (WESTON & MARUYA, 2002).66

Atualmente, faz-se uso de mais de 260 moluscos no monitoramento biológico de contaminação por COEs em todo o mundo (TITLEY-O'NEAL et al., 2011). Esses compostos causam disrupção endócrina nos gastrópodes, sendo que em fêmeas de neogastrópodes levam à sobreposição de caracteres masculinos, alteração denominada de *Imposex* (ALZIEU, 1986). Já no mesogastrópode *Littorina littorea* (L.) foi observada a substituição gradual do oviduto palial por uma próstata, o desenvolvimento de um pênis similar ao dos machos e de um ducto espermático (próstata), alteração que foi chamada de *Intersex* (BAUER et al., 1995). No Brasil, o monitoramento da contaminação costeira por COEs tem sido feita utilizando neogastrópodes marinhos (CASTRO et al., 2011), mas nenhum deles tem associação obrigatória a estuários (COSTA et al., 2013).

Ensaio ecotoxicológicos realizados em condições controladas, com o uso de organismos vivos, são importantes na avaliação da toxicidade de águas e sedimentos contaminados com substâncias químicas, já que permitem estimar efeitos de xenobióticos em determinadas concentrações para uma determinada espécie (BARBOSA et al., 2010). A escolha do organismo aquático para utilização nesses testes obedece a critérios como: abundância e ampla distribuição da espécie, uniformidade e estabilidade genética das populações, representatividade de seu nível trófico, conhecimento da fisiologia e comportamento da espécie, facilidade de coleta e adaptação às condições de laboratório (RAND & PETROCELLI, 1985).

De acordo com Ronco et al. (2004), devido à complexidade dos ambientes aquáticos e ao grande número de processos aos quais um contaminante está sujeito nesses sistemas, é difícil extrapolar para uma escala ambiental as informações provenientes dos testes de toxicidade realizados em laboratório. Ainda de acordo com esses autores, para que os efeitos em escala ambiental possam ser preditos a partir desses testes, as informações toxicológicas devem ser conectadas a respostas ambientais dos modelos populacionais.

Littoraria angulifera (Lamarck, 1822) (Caenogastropoda: Littorinidae) é uma espécie neotropical anfi-Atlântica, que ocupa zonas do supralitoral e do

mediolitoral (MARCUS & MARCUS, 1998). É encontrada principalmente nos troncos e nas raízes das árvores do mangue e em substratos consolidados naturais ou artificiais, geralmente em enseadas, onde se alimenta de fungos e de algas epífitas (REID et al., 1986; MERKT & ELLISON, 1998). Por ser detritívora e microfágica, é importante para o fluxo de nutrientes em estuários, já que é um elo entre os produtores primários e os consumidores (MERKT & ELLISON, 1998). No Brasil, *L. angulifera* distribuiu-se do Ceará até Santa Catarina, sendo muito abundante na região costeira do Nordeste do país (MATTHEWS-CASCON & LOTUFO, 2006). É um gastrópode de fácil captura e de associação obrigatória ao sistema estuarino, mas, apesar disso, poucos estudos utilizam a espécie como bioindicadora da qualidade ambiental desses ecossistemas (COSTA et al., 2013; MARTÍNEZ et al., 2013). Alguns aspectos do ciclo reprodutivo e do comportamento dessa espécie foram abordados por Zeidan et al. (Capítulo 3, presente tese), que fizeram, também, um estudo morfométrico do aparelho reprodutor em machos e em fêmeas nesse estudo.

Objetivou-se neste estudo avaliar alterações morfométricas em *L. angulifera* exposta experimentalmente ao TBT, com vistas ao uso dessa espécie como bioindicadora desse contaminante em ambientes estuarinos.

Material e Métodos

Área de estudo

O estudo foi realizado em estuários do litoral sul da Bahia, nordeste do Brasil. Além dos manguezais, essa faixa litorânea apresenta bancos de areia, florestas tropicais e zonas úmidas e esses ecossistemas estão inseridos no bioma da Mata Atlântica, conforme consta no Decreto Federal 750/93 (CONAMA, 1993). A vegetação predominante da região é o mangue vermelho *Rhizophora mangle* (L.) e o mangue branco *Laguncularia racemosa* (L.) O clima da região é quente e úmido, com temperatura média anual de 25°C e com precipitação pluviométrica de 2.400 a 2.500 mm ao ano (CRA, 1995). As marés são semidiurnas, com uma amplitude de maré máxima de 2,2 m (DHN, 2016).

Licenciamento ambiental

Todas as coletas foram realizadas mediante autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Brasil, para atividades com finalidade científica (Licença número 20912-3).

Procedimentos de campo e de laboratório

Delineamento geral

As amostragens foram realizadas em três municípios do sul da Bahia (Ilhéus, Uruçuca e Camamu) (**Figura 1**), escolhidos de acordo com os níveis de *Imposex* observados em *Stramonita rustica* (Gastropoda) (ZEIDAN & BOEHS, 2017), em áreas com alta atividade naval como um atracadouro (A1) (13°56'54.0"S 39°06'13.2"S), estaleiros (A2) (13°57'492"S; 039°01'783W), ambos situados no entorno da cidade de Camamu, e em uma marina (A3) (14°809'484"S; 39°839'349"W) na cidade de Ilhéus. Um quarto local (A0), de baixa antropização (ZEIDAN et al., Capítulo 3, presente tese), localizado no Rio Sargi (Barra do Sargi), Uruçuca, Bahia (14° 30'743" S; 039°02'192"W) foi escolhido como controle (**Figura 1, Tabela 1**). Todas as coletas e processamentos foram feitas ao longo do ano de 2016.

Tabela 1. Biometria das fêmeas de *Littoraria angulifera* analisadas de três locais potencialmente contaminados por TBT no sul da Bahia (A1, A2 e A3) e de um ambiente controle (A0). A0 = Controle negativo do ambiente; A1 = Atracadouro; A2 = Estaleiro; A3 = Marina. n total = 142.

	A0	A1	A2	A3
n	60	25	32	25
Média de tamanho±DP (mm)	22,38±0,67	21,66± 2,44	17,62±3,34	20,45±1,46
Média de peso ±DP (g)	1,45±0,34	1,59±0,51	0,88±0,51	1,45±0,33

Foram analisadas apenas fêmeas, uma vez que nestas são morfologicamente perceptíveis os efeitos da disrupção endócrina causados pelo TBT (vide revisão de Zeidan & Boehs, Capítulo 1, presente tese). Os espécimes

foram coletados na baixa-mar, seja em troncos de *Rhizophorae mangle* (L.) e em substratos artificiais, como estruturas de concreto e *piers*. Estes foram conduzidos em sacos plásticos identificados ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e acondicionados em aquários com capacidade de 5L até o seu processamento, a temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ e arejamento constante e com pouca quantidade água do mar, em concentração salina de em torno de 30 Unidades Práticas de Salinidade (UPS), apenas para manter o ambiente úmido.

Foram, ao todo, analisados 646 exemplares de *L. angulifera*, dos quais 504 foram utilizados em dois ensaios (experimentos I e II) e 142 foram analisados em estudo descritivo.

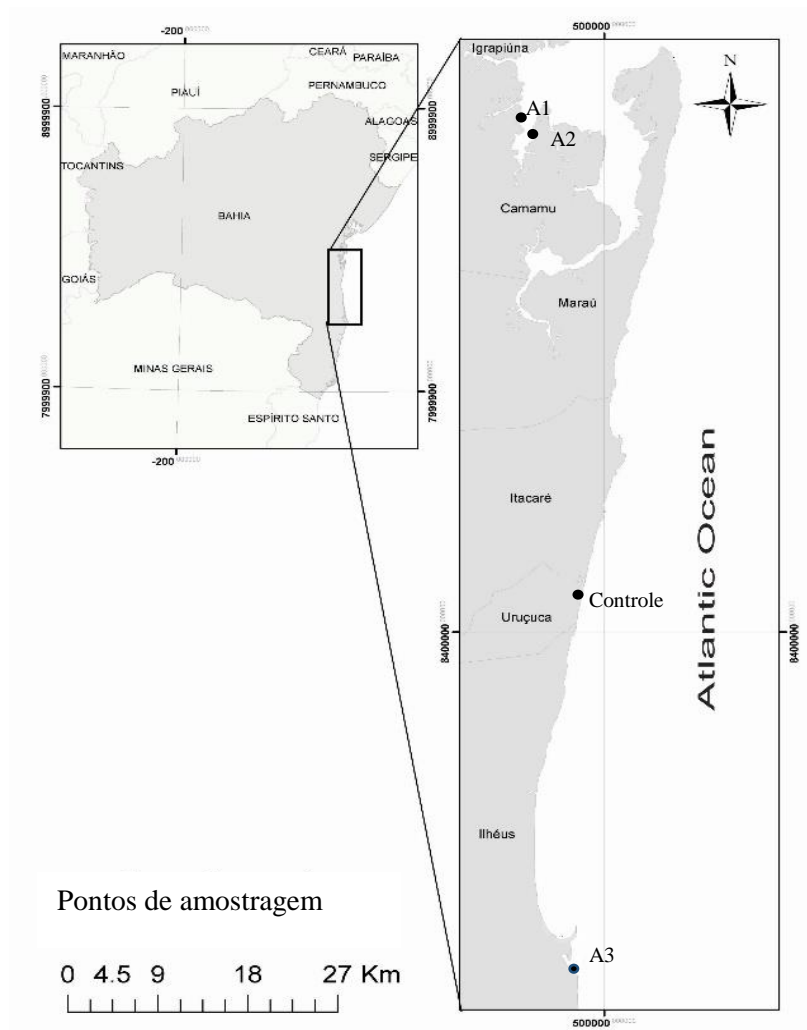


Figura 1. Pontos de amostragem de *Littoraria angulifera* no litoral sul do estado da Bahia, Brasil.

Ensaio I – Via dieta contaminada

Um experimento piloto foi realizado inicialmente para verificar se *L. angulifera* ingeria papel, uma vez que foi observado, acidentalmente, que os animais ingeriam o papel vegetal das etiquetas que acompanhavam as amostras. Este estudo, que teve a duração de 2 meses, confirmou que os animais procuravam e ingeriam avidamente papel, havendo sobrevivência de 100% dos animais alimentados deste modo.

Para o ensaio com o Cloreto de TBT (TBTCl) (Sigma-Aldrich), foram utilizadas 384 fêmeas do local controle (A0), que foram divididas em dois grupos, o primeiro contendo indivíduos com altura de concha entre 15 e 16 mm (Média: 15,895; DP \pm 0,663 mm) e o segundo com indivíduos com altura de concha medindo entre 19 e 20 mm (Média: 20,027; DP \pm 0,591 mm) (**Tabela 1**), presumindo a existência de diferenças morfométricas relacionadas ao tamanho e maturidade sexual na espécie, apontadas por [Lenderking \(1954\)](#). Em laboratório, os espécimes foram medidos, pesados e mantidos por 15 dias em aquário de 5L de capacidade, para aclimação, em temperatura de 25 ± 1 °C, com aeração controlada e com um pequeno volume de água do mar disposto no fundo (\pm 100-150 mL) para manter a umidade dos aquários, sendo a água repostada antes que evaporasse totalmente. Os animais foram alimentados com papel do tipo Sufite, 210 X 297 mm, de composição típica de Lignocelulósicos, molhado em água do mar em diluição de 30 UPS (Unidades Práticas de Salinidade). Após a aclimação, os animais foram novamente medidos e pesados e então divididos em quatro tratamentos, conforme detalhado na **tabela 2**. O papel foi cortado em fragmentos com cerca de 1cm², que eram pesados e depois encharcados com diferentes soluções: (i) controle negativo com água do mar, (ii) controle negativo com Dimetil sulfóxido (DMSO), (iii) solução de TBTCl (0,5µg/L TBT) e (iv) solução de TBTCl (1µg/L TBT), conforme cada tratamento (**Figura 2**). Depois

de secos ao ambiente, os papéis eram novamente pesados, para determinar o remanescente da solução após a secagem. Antes de ser disponibilizado, o papel era umedecido em água do mar e colocado nos boxes e, semanalmente, era avaliado o consumo de cada animal através da contagem com papel milimetrado (mm^2), assim como era avaliada a mortalidade em cada tratamento. A oferta de alimento foi constante (*ad libitum*), de acordo com o forrageio dos animais. Ao final de 2 meses, os animais foram narcotizados com solução salina de MgCl_2 a 10%, (Zeidan, 2017, Capítulo 2, presente tese) e sacrificados para análise, sob microscópio estereoscópico

Tabela 2. Ensaio com *Littoraria angulifera* via dieta contaminada com TBT em papel A4. T0 - Tratamento Controle com água do mar; T1 - Tratamento Controle com Dimetil sulfóxido (DMSO); T2 - Tratamento com cloreto de TBT a $0,5\mu\text{g/L}$; T3 - Tratamento com cloreto de TBT a $1,0\mu\text{g/L}$ de TBT diluído em DMSO. n= 384.

Tratamentos	Grupo 1 (15-16mm)	Grupo 2 (19-20mm)
T0	48	48
T1	48	48
T2 ($0,5\ \mu\text{g/L}$)	48	48
T3 ($1,0\ \mu\text{g/L}$)	48	48
n total	192	192

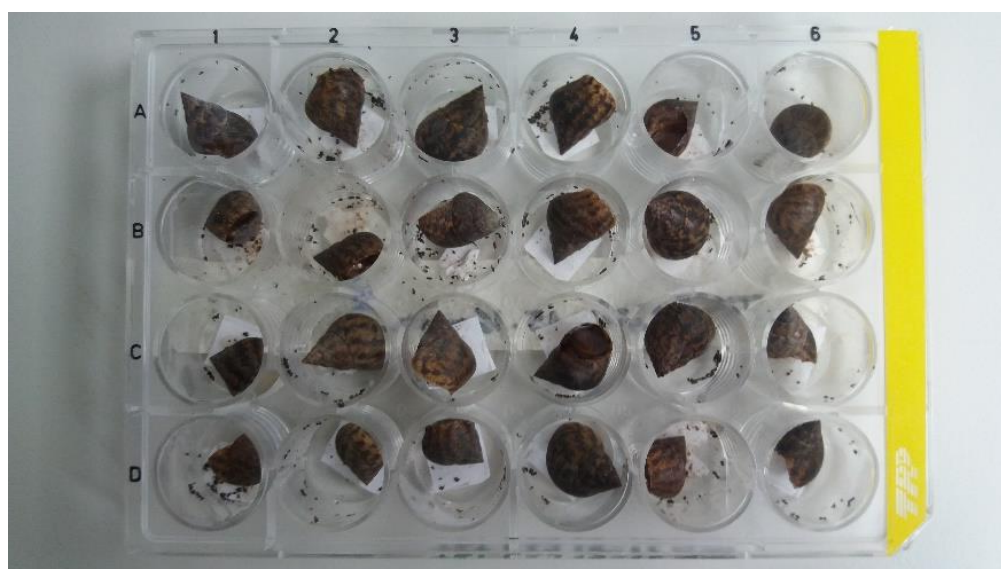


Figura 2. Aspecto de uma placa utilizada no Ensaio I - Via alimentação por papel contaminado com Cloreto de Tributíil-Estanho (TBT) (tratamentos T2 e T3) em solução de DMSO e não contaminado contendo apenas água do mar (T0) e solvente DMSO (T1).

Ensaio II – Injeções com Cloreto de TBT

Para o Ensaio II, foram utilizadas 120 fêmeas de *L. angulifera* coletadas na estação controle (A0), medindo entre 20 e 25 mm de altura de concha (Média= 20,02; DP \pm 0,59 mm). A escolha de fêmeas com altura de concha acima de 20 mm esteve relacionado à inviabilidade de injetar a solução em animais menores a esse tamanho. Nestas 120 fêmeas, foram injetadas as soluções com DMSO (E1) e com Cloreto de TBT (E2). Além destas, foram adicionalmente usadas 60 fêmeas, com o mesmo intervalo de altura de concha e peso das demais, na estação controle, como controle negativo ambiental (A0), totalizando 180 animais (**Tabela 3**).

Tabela 3. Biometria das fêmeas de *Littoraria angulifera* analisadas no Ensaio II, via injeção com Dimetil sulfóxido (DMSO) (E1) e por cloreto de Tributíil-estanho (E2). n total: 120.

	E1	E2
n	60	60
Média de tamanho \pm DP (mm)	21,93 \pm 1,18	22,04 \pm 1,33
Média de peso \pm DP (g)	1,85 \pm 3,23	1,70 \pm 0,27

Após 15 dias do período de aclimação, os animais foram narcotizados com solução salina de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) a 10% de água destilada (ZEIDAN et al., Capítulo 4, presente tese) durante uma hora. A solução de Cloreto de Tributíil-Estanho (TBTCl) constou de 1 μ g/L TBTCl/ 1 μ g/L DMSO, que foi utilizada de acordo com o peso corporal total (partes moles + concha) de cada animal. O volume de solução aplicado correspondia sempre a uma dose de 4 μ gTBT/g de peso corporal total (PCT) de cada animal. Assim, os exemplares receberam injeções de, no mínimo, 1,23 μ L e no máximo 2,75 μ L de solução, de

acordo com seu peso. Os animais do E1 também foram narcotizados e então inoculados com 4 μ g/g de DMSO/g de PCT. As injeções foram feitas no pé dos animais, utilizando-se microseringas cromatográficas Hamilton de 5 μ L, com graduações de 0,2 μ L (**Figura 3**). As análises foram realizadas com 45 dias após injeção. Para estas, os animais de cada grupo foram novamente narcotizados (MgCl₂, 10%) e então sacrificados para observação e fotografia em microscópio estereoscópio (Leica), usando-se como parâmetro os caracteres morfométricos sexuais dos animais controle ambiental.



Figura 3. Injeção de DMSO, Ensaio II.

Análise de dados

Os caracteres biométricos analisados em ambos ensaios e nos animais coletados diretamente no ambiente foram o comprimento do oviduto palial (COP) e a distância entre a vulva e o ânus (DAV) e a altura da concha (AC), conforme detalhado em [Zeidan 2017 \(Capítulo 3, presente tese\)](#). Visando determinar as diferenças entre os parâmetros analisados, foram comparados inicialmente os tratamentos controle entre si e posteriormente aos tratamentos expostos ao TBT (Ensaio I) e às estações potencialmente contaminadas (Ensaio II), através do teste *t* de Student e seu representante não paramétrico Mann-Whitney quando não havia normalidade entre os dados, ao nível de significância de 5%. O pacote estatístico o SigmaStat 3.5. Adicionalmente, foi contabilizada a mortalidade em cada tratamento.

Resultados

Conforme resumido na **tabela 4**, a mortalidade foi alta em ambos os ensaios (Ensaio I = 46,09%; Ensaio II = 47,5%), independentemente dos tratamentos. Mas, nos animais injetados com TBT, a mortalidade atingiu 75% ao final do Ensaio II.

Tabela 4. Dados referentes à sobrevivência e à sensibilidade ao TBT nos ensaios realizados com *Littoraria angulifera*. DMSO = Dimetil sulfóxido; TBT= Tributílestanho.

	Ensaio I			Ensaio II	
	Água do mar	DMSO	TBT	DMSO	TBT
n inicial	96	96	192	60	60
n final	48	44	85	46	15
Alterações na morfologia	Não	Não	Sim	Não	Sim

A **tabela 5** mostra o número de animais no início e no final do Ensaio I, assim como os valores das médias/desvio padrão dos parâmetros morfométricos, a quantidade total de papel consumida e o volume de soluto/reagente final absorvido via dieta.

Tabela 5. Ensaio I – via dieta: sobrevivência, altura da concha (AC), peso (P), comprimento do oviduto palial (COP), distância entre o ânus e a volta (DAV), total de papel consumido (PC) e volume de soluto/reagente final absorvido (VC). T0= Controle negativo com água do mar (15-16 mm); T0a = Controle negativo com água do mar (19-20 mm); T1= Controle negativo com solução de DMSO; T1a = Controle negativo com solução de DMSO 19-20 mm; T2 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm) T2a= Tratamento TBT 1µg/L-(19-20 mm); T3 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm); T3a 1µg/L g (19-20 mm). AC = altura da concha (mm); PC = papel consumido (mm²); VC = volume consumido (mm³); P = peso (g). Biometria expressa em médias/desvio padrão.

	15-16mm				19-20mm			
	T0	T1	T2	T3	T0a	T1a	T2a	T3a
n inicial	48	48	48	48	48	48	48	48
n final	27	23	17	18	21	21	14	36
AC	15,905±0,758	15,550±0,818	15,997±0,568	15,740±0,507	19,860±0,600	20,021±0,625	19,902±0,584	19,991±0,610

P	0,449±0,098	0,431±0,99	0,603±0,094	0,533±0,064	1,188±0,116	1,229±0,131	1,238±0,131	1,120±0,156
COP	3,518±0,284	3,463±0,290	4,252±0,481	4,497±0,282	4,479±0,738	4,720±0,746	5,731±0,596	5,673±0,725
DAV	2,127±0,247	2,127±0,234	1,166±0,505	0,968±0,232	2,453±0,248	2,556±0,263	1,047±0,503	1,350±0,566
PC	5745	1496	825	863	9546	3823	0	5968
VC	0,17	0,2992	0,03	0,01	0,19	0,34	0	0,48

Com relação ao Ensaio II, o número de sobreviventes, os valores das médias com os respectivos desvios dos parâmetros morfométricos dos animais de ambos controles e injetados com TBT (E2), assim como os de áreas contaminadas por TBT (A1, A2 e A3) estão apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6. Valores das médias e desvios padrões dos parâmetros morfométricos nos seis tratamentos do ensaio II. Controle; E1 – Controle DMSO; E2 – Injeção TBT; A1 – Atracadouro; A2 – Estaleiro; A3 - Marina. AC = altura da concha (mm); P = peso (g), COP = comprimento do oviduto palial (mm); DAV = distância entre o ânus e a vulva (mm). Biometria expressa em médias/desvio padrão.

Tratamentos	Controle	Controle DMSO	E2	A1	A2	A3
N	60	46	15	25	32	25
AC	22,403±1,552	21,931±1,185	21,258±0,956	20,455±1,465	17,622±0,518	21,664±2,447
P	1,87±3,27	1,45±0,33	1,357±0,266	1,454±0,337	0,88±1,242	1,594±0,510
COP	5,316±0,646	5,447±0,708	6,728±0,683	5,154±0,806	4,863±0,460	6,215,±1,151
DAV	2,683±0,498	2,459±0,356	1,280±0,683	1,926±0,632	1,136±0,460	1,464±0,607

No ensaio I, os parâmetros analisados (COP e DAV) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os controles negativos entre as classe de tamanho 15-16mm, diferente do observado com relação ao controle ambiental e o controle com DMSO – T1 ($p < 0,001$) das fêmeas com altura entre 19-20 mm (**Tabela 7**). Nos demais tratamentos, em ambas concentrações de TBTC1 na dieta oferecida às fêmeas e em ambas classes de tamanho analisadas, foram observadas diferenças significativas dos parâmetros quando comparados ao controle, com excessão da DAV das fêmeas entre 15-16mm quando expostas à

dieta enriquecida com 0,5µg/L por TBTCI. O COP mostrou-se, na maioria dos tratamentos, mais alongado ($p < 0,05$) e a DAV reduzida ($p < 0,05$) quando comparadas às fêmeas de tratamentos controle.

Tabela 7. Resultados do teste t (t) e seu representante não paramétrico Mann-Whitney (U^*) das comparações dos parâmetros analisados no Ensaio I (dieta enriquecida com TBTCI). COP= Comprimento do oviduto palial; DAV= Distância entre o ânus e a

Variável	Grupo	Fonte de variação	N	U^* ou t	P
COP	15-16mm	T1	23	-1,095	0,279
		T2	17	130,500*	0,018
		T3	18	-3,242	0,002
DAV	15-16mm	T1	23	-0,604	0,549
		T2	17	311,000*	0,051
		T3	18	352,500*	0,011
COP	19-20mm	T1a	21	-3,960	<0,001
		T2a	14	-6,723	<0,001
		T3a	36	730,000*	<0,001
DAV	19-20mm	T1a	21	623,000*	<0,001
		T2a	14	117,000*	<0,001
		T3a	36	136,000*	<0,001

vulva; T1= Controle negativo com solução de DMSO; T1a = Controle negativo com solução de DMSO 19-20 mm; T2 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm) T2a= Tratamento TBT 1µg/L (19-20 mm); T3 = Tratamento TBT 0,5µg/L (15-16 mm); T3a 1µg/L g (19-20 mm).

Os parâmetros analisados neste estudo não apresentaram diferenças significativas entre os controles no ensaio 2 (**Tabela 7**). Os espécimens da estação A3 (marina) não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto à altura e ao comprimento do oviduto palial (**Tabela 8**). Com relação às fêmeas das estações A1 e A2, ambos localizados em Camamu (em regiões de estaleiros naval, atracadouro e com grande quantidade e movimentação de pequenas

embarcações de passeio e pesca), apresentaram diferenças significativas em relação a todos os parâmetros analisados, exceto a DAV da A1, quando comparadas ao controle.

Tabela 8. Resultados do teste *t* (*t*) e seu representante não paramétrico Mann-Whitney

Variável	Fonte de variação	N	U* ou <i>t</i>	P
AC	DMSO	46	1610,000*	0,143
	A1	25	5,358	<0,001
	A2	32	1725,000*	<0,001
	A3	25	895,500*	0,162
COP	DMSO	46	1214,500*	0,293
	A1	25	7,011	<0,001
	A2	32	1535,500*	<0,001
	A3	25	1,507	0,135
DAV	DMSO	46	956,500*	0,007
	A1	25	754,000*	0,973
	A2	32	1853,500*	<0,001
	A3	25	1243,000*	<0,001

(U*) das comparações dos parâmetros analisados do controle com as demais estações.

AC= Altura da concha; A1= Atracadouro, A2= Estaleiro, A3= Marina; COP= Comprimento do oviduto palial; DAV= Distância entre o ânus e a vulva, DMSO= Controle negativo com Dimetil sulfóxido

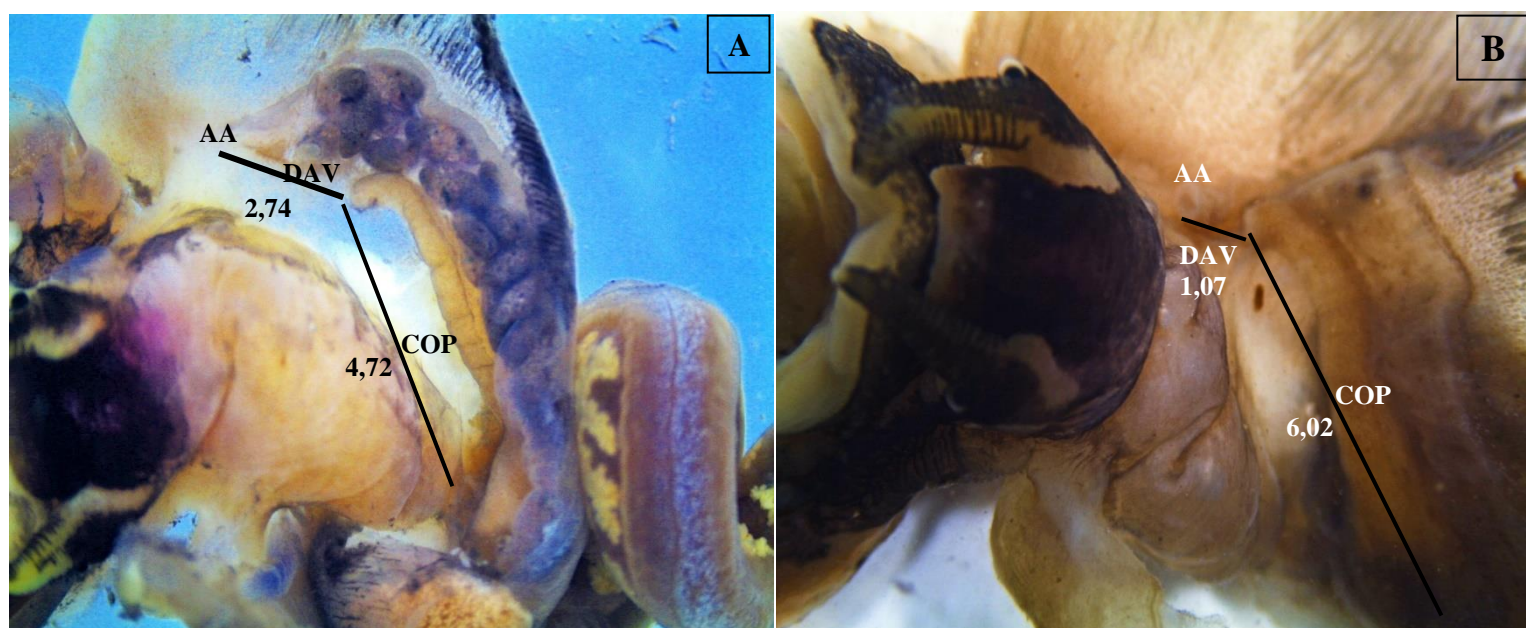


Figura 4. Morfometria do aparelho reprodutivo de *Littoraria angulifera*. (A) Fêmea do tratamento T0a (19-20 mm) vista ao microscópio estereoscópico. (B) Fêmea do tratamento T3a (19-20 mm) evidenciando as diferenças morfológicas entre os tratamentos. AA = Abertura anal; COP = Comprimento do oviduto palial; DAV = Distância do ânus à vulva (mm).

A **figura 5** mostra os valores do comprimento do oviduto palial (COP) e da distância da abertura entre o ânus e a vulva dos três tratamentos (campo, Ensaio I e Ensaio II), evidenciando o aumento no COP e diminuição do DAV nas fêmeas expostas ao TBT.

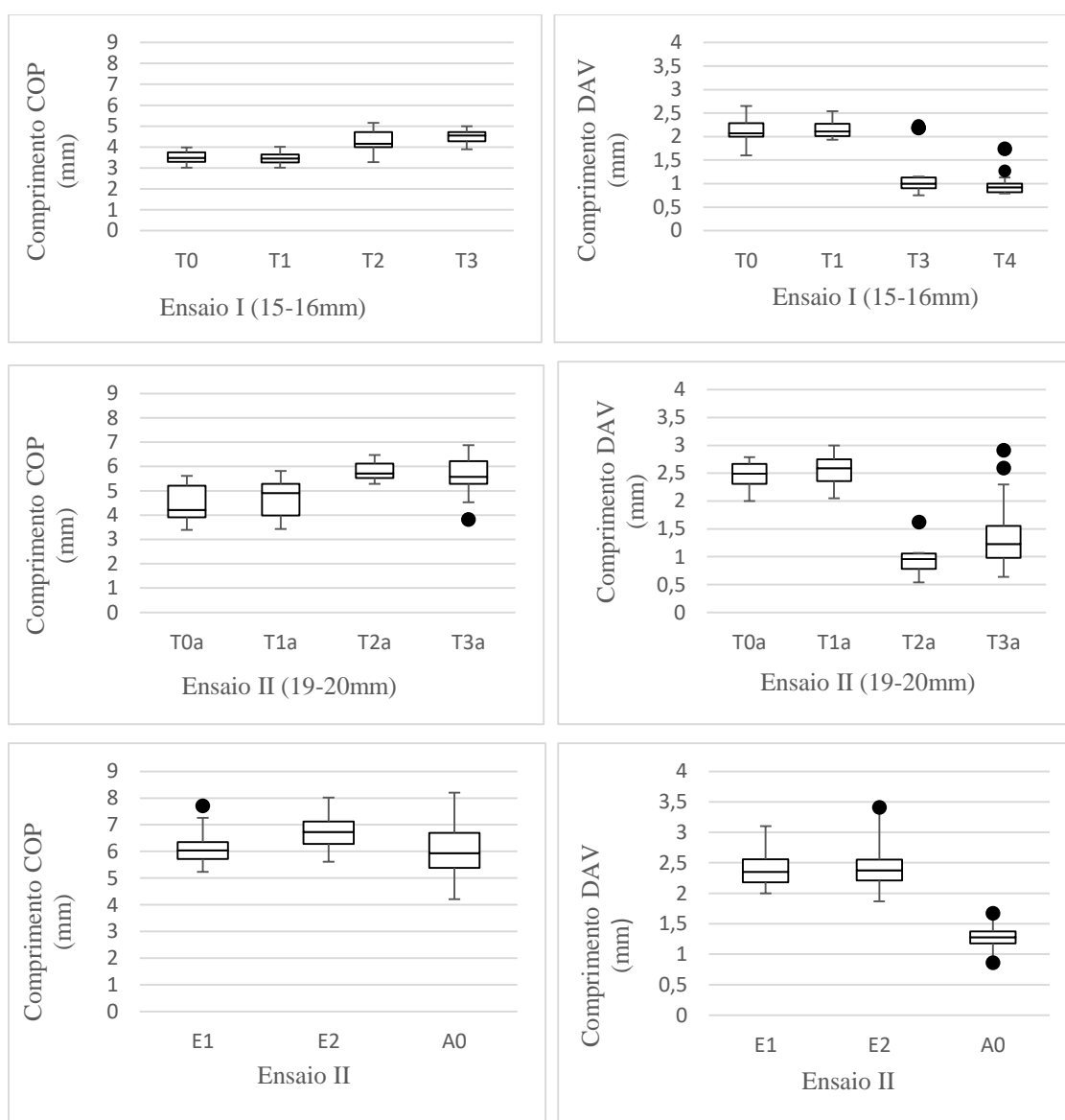


Figura 5. Gráficos Box-Plot para os valores do comprimento do oviduto palial (COP) e da distância entre a abertura do ânus a vulva (DAV) nos três tratamentos.

Discussão

Áreas com grande fluxo de embarcações são susceptíveis à contaminação por TBT, uma vez que esses compostos são usados como biocidas para cascos de embarcações (READMAN, 2006). Um dos efeitos que tais compostos causam é a disrupção endócrina nos gastrópodes, levando a sobreposição de caracteres masculinos em fêmeas de neogastrópodes, alteração denominada de *Imposex* (ALZIEU, 1986). Já no mesogastrópode *Littorina litorea* (L.) exposta a altas concentrações de TBT foi vista a substituição gradual do oviduto palial por uma próstata, o desenvolvimento de um pênis similar ao dos machos e de um ducto espermático, a que se denominou de *Intersex* (BAUER et al., 1995).

Os mesogastrópodes são conhecidos por serem pouco sensíveis à contaminação por COEs (BAUER, et al., 1995), no entanto, representam alternativas para locais onde não há neogastrópodes, como os manguezais. O mesogastrópode *Littoraria angulifera* obedece aos critérios de seleção para organismos-teste para avaliação da contaminação ambiental, conforme critérios previamente preconizados por Rand e Petrocelli (1985) para regiões estuarinas.

Os ensaios de toxicidade realizados neste estudo foram do tipo crônico (SCHVARTSMAN, 1991), apesar de as injeções terem sido administradas em um único momento e à concentração relativa ao peso do animal. A sobrevivência foi semelhante em ambos os experimentos, as diferenças mostram-se no número de classes de tamanho que puderam ser contempladas, nas concentrações administradas no experimento e no tempo de exposição ao TBT, que foram maiores no Ensaio I. O maior pico de mortalidade foi observado no Ensaio II, sempre seguinte às inoculações, provavelmente devido ao efeito combinado do estresse causado pela introdução da agulha no pé dos animais e do Cloreto de Tributil-estanho, assim como observado por Azevedo (2011) no neogastrópode *Stramonita haemastoma*.

Neste estudo, foi observado que em ambientes de maior impacto antrópico, como as estações A1 (atracadouro) e A2 (estaleiro), os animais foram significativamente menores que nas demais estações amostrais, possivelmente

relacionado a atividades antropogênicas e maior exposição à dessecação. Resultados similares foram observados por Zeidan et al. (Capítulo 3 – presente tese), ao realizar a biometria desta espécie ao longo do litoral sul da Bahia. Pelo fato de *L. angulifera* ser uma espécie exclusivamente estuarina, esses resultados traduzem, em parte, a sanidade desses ambientes, sendo que a espécie funciona nesse caso como bioindicadora, uma vez que responde plasticamente a perturbações ambientais (MELO et al., 2012)

A descrição do aparelho reprodutor de *L. angulifera* foi feita inicialmente por Marcus e Marcus (1963) e posteriormente por Merkt e Ellison (1998) e por Reid (1999). Os primeiros autores, em um estudo realizado em populações anfi-Atlânticas, concluíram que estas possuem uniformidade na forma e tamanho genitais. No estudo realizado por Zeidan et al. (Capítulo 3, presente tese), foi confirmada a validade de uso da morfometria dos gonodutos como parâmetro para estudos de eventos reprodutivos na espécie e para diferenciação morfométrica entre os sexos. Nos ensaios realizados no presente estudo, bem como na área controle selecionada, a morfometria do oviduto palial (COP) e da distância entre o ânus e a vulva (DAV) das fêmeas do controle negativo, foram semelhantes entre si, assim como as médias observados por Zeidan et al. (Capítulo 3, presente tese) para esses parâmetros em outras amostras de fêmeas de *L. angulifera*.

As análises morfométricas realizadas com as fêmeas coletadas em locais contaminados (A1 e A2), dos ensaios I e II, mostraram diferenças significativas na morfometria sexual quando os animais eram expostos ao TBT. Nessas fêmeas, o oviduto palial apresentou-se mais alongado e a DAV foi inferior, aparentemente imitando a morfometria dos machos da espécie (ZEIDAN et al., Capítulo 3, presente tese) indicando masculinização das fêmeas em função de exposição a esse contaminante (ZEIDAN et al., capítulo 1, presente tese). Ao comparar a morfometria de machos e fêmeas de *L. angulifera*, Zeidan et al. (Capítulo 3, presente tese) constataram que comprimento do gonoduto masculino foi significativamente maior do que o feminino e a distância entre a abertura

genital ao ânus foi significativamente menor nos machos. Essa diferença está ligada às características reprodutivas da espécie. *Littoraria angulifera*, como ovovivípara, choca seus ovos entre as lamelas branquiais na cavidade do manto e os libera posteriormente na lâmina d'água (MARCUS & MARCUS, 1963; REID, 1999), o que justifica o comprimento do oviduto palial ser menor que a próstata, que fica próxima ao ânus e à abertura do opérculo (ZEIDAN et al. Capítulo 3, presente tese). O mesmo é válido para a distância entre a abertura do gonoduto feminino ao ânus ser maior nas fêmeas. Os machos possuem um ducto espermático aberto, localizado logo no final da próstata, responsável por levar o esperma ao pênis (REID, 1999).

O TBT é conhecido por causar modificações fisiológicas e anatômicas no aparelho reprodutor de mais de 260 gastrópodes (TITLEY-O'NEAL et al., 2011). As alterações observadas neste estudo evidenciam a sensibilidade de *L. angulifera* a este composto. O prolongamento do oviduto palial pode comprometer a liberação das larvas para o ambiente, uma vez que estas, como supramencionado, ficam alojadas nas lamelas branquiais na cavidade do manto para serem chocadas. Com a aproximação da abertura da vulva a abertura anal, os ovos ficam mais susceptíveis a serem liberados diretamente na água antes da metamorfose, correndo um maior risco de inviabilidade.

Em ambos os experimentos deste estudo, a relação dose-efeito do TBT com relação à DAV foi semelhante, independente das concentrações em que as fêmeas foram expostas e de suas classes de tamanho, ou seja, juvenis e adultas responderam às concentrações de TBT a partir de 0,5µg/L de TBTCl, corroborando observação anterior de Lenderking (1954). Esses resultados podem estar relacionados à via de absorção do TBT. Por tratar-se de um composto lipofílico, este se acumula preferencialmente em tecidos com alto conteúdo de lipídios, como reprodutivos e digestivos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Nos gastrópodes, a absorção de TBT dissolvido ocorre primeiramente nos tecidos associados ao manto que, similarmente aos órgãos reprodutivos e glândula digestiva, possuem importante papel na degradação do TBT (WANG et al.,

2010), confirmando ambas as vias de absorção (injeção e dieta contaminada) através dos ensaios.

Ao serem liberados na água, compostos organoestênicos como o TBT, sofrem diversos processos de natureza física, química e biológica, podendo ser depositados no sedimento superficial, por um tempo de 0,9 a 5,2 anos (GIBBS & BRYAN, 1994) e/ou serem incorporados pelos organismos aquáticos (MAGUIRE, 1996; ANTIZAR-LADISLAO, 2008). A grande afinidade do TBT por material particulado, devido à sua alta hidrofobicidade, faz com que este composto permaneça pouco tempo na coluna d'água e acumule-se em sedimentos finos como as lamas estuarinas (LANGSTON & POPE, 1995). Dessa forma, para a avaliação e monitoramento ambiental de ecossistemas aquáticos, é importante analisar a toxicidade dos sedimentos. Em nível local, faz-se necessário posteriormente, a coleta e análise de sedimento em diversos pontos ao longo do litoral do estado da Bahia, para verificar a contaminação por TBT nesta matriz, correlacionar os resultados ambientais com os biológicos e determinar a biomagnificação em *L. agulifera*.

Uma análise detalhada das mudanças anatômicas causada pelo TBT nas fêmeas de *L. angulifera* poderia ser realizada, examinando os animais através de seções histológicas dos órgãos-alvo, mediante uso tanto de indivíduos normais de ambos os sexos quanto fêmeas afetadas, similarmente ao realizado por Santos et al. (2014), que propuseram *Gemophos viverratus* (Kiener, 1834) como novo bioindicador para a costa Africana. Para a verificação da eficiência reprodutiva, choques térmicos podem ser utilizados para observação e quantificação de larvas liberadas antes da análise morfométrica em fêmeas afetadas e não afetadas, considerando que a temperatura é um fator que influencia diretamente a postura no gênero *Littoraria* (REID, 1999).

Os ensaios conduzidos neste estudo, em conjunto com as análises dos animais coletados diretamente do campo, somadas às observações morfométricas verificadas por Zeidan et al. (Capítulo 3, presente tese), mostraram que *L. angulifera* obedece aos critérios de escolha para organismo teste para a

contaminação por TBT e que as fêmeas quando expostas ao TBTCl, sofrem modificações nos parâmetros morfométricos sexuais, sofrendo masculinização, como observado nos ensaios e nos locais com grande potencial de contaminação por TBT. Confirma também o uso do comprimento do oviduto palial, que apresenta uma forte correlação observada por [Zeidan et al. \(Capítulo 3, presente tese\)](#), assim como da distância do ânus à vulva como parâmetros adequados para uso em estudos de TBT em fêmeas dessa espécie.

Referências Bibliográficas

ALZIEU, C. TBT Detrimental Effects on Oyster Culture in France - Evolution since antifouling paint regulation. **Oceans**, p. 1130-1134, 1986.

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

AZEVEDO, D. B. Imposex em *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Gastropoda): reavaliação na zona metropolitana de fortaleza e indução em condições de laboratório. (Dissertação de mestrado, Programa de Ciências Marinhas da Universidade Federal do Ceará).

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320-325, 2010.

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

CASTRO, I. B.; ARROYO, M. F.; COSTA, P. G.; FILLMANN, G. Butyltin Compounds and Imposex Levels in Ecuador. **Archives of Environmental Contaminant Toxicology**, v. 62, p. 68-77, 2011.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brazil. 1993. Resolution Number 10, of October 1, 1993. Diário Oficial da União (DOU) 209, p. 16497-16498.

COSTA, M.B.; ZAMPROGNO, G.C.; PEDRUZZI, F.C.; DALBEM, G.B. & TOGNELLA, M.M.P. 2013. Assessing the continuous impact of Tributyltin from Antifouling Paints in a Brazilian mangrove area using Intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. **International Journal of Oceanography**, p. 1-8, 2013.

Conselho Regional de Administração da Bahia – CRA. Publicações, Bahia, 1995. Salvador (BA).

DHN - Diretoria de Hidrografia e Navegação. Marinha do Brasil. Tábuas de marés de 2014 a 2016. Available in: <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/>

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P.L.; BURT, G. R. The use of dogwhelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. **Journal of the Marine Biological Association. U.K.** v.67, p. 507 – 523, 1987.
GOLDBERG, E. D. TBT: an environmental dilemma. **Environment**, 28: 17-44. 1986.

LANGSTON, W.J. & POPE, N.D. Determinants of TBT Adsorption and Desorption in Estuarine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 3, p.32-43, 1995.

LENDERKING, R.E. Some recent observations on the biology of *Littorina angulifera* Lam. of Biscayne and Virginia Keys, Florida. **Bulletin of Marine Science of the Gull and Caribbean**. v. 3, p. 273-295, 1954.

MAGUIRE, R. J. The occurrence, fate and toxicity of tributyltin and its degradation products in fresh water environments. In: **Tributyltin: case study of an environmental contaminant**. DE MORA S. J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p. 94–138.

MARCUS, E.; MARCUS, E. Mesogastropoden von der Küste São Paulos. *Akademie der Wissenschaften: Abhandlungen der math.-naturw. Klasse*, v. 1, p. 1-105. 1963.

MATTHEWS-CASCON, H.; LOTUFO, T.M.C. Biota marinha da costa oeste do Ceará. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2006.

MARTÍNEZ, S.; MAHIQUES, M. M.; BURONE, L. Mollusks as indicators of historical changes in an estuarine-lagoonal system (Cananéia-Iguape, SE, Brazil). *The Holocene*, v. 23, p. 888-897, 2013.

MCCARTY; L.S.; MUNKITTRICK, K.R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Human Ecology Risk Assessment* v. 2, p. 268-74. 1996.

MELO, C.G.B.; MAIA, R.C.; ROCHA-BARREIRA, C.A. 2012. Shell morphology variation and population density of *Littoraria angulifera* (Mollusca: Gastropoda) in mangrove forests of Ceará State, Brazil. *Arquivo de Ciências Marinhas*, 45: 68-76.

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

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

O'CONNOR, R.J. Toward the incorporation of spatiotemporal dynamics into ecotoxicology. In: **Population dynamics in ecological space and time**.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (eds.). New York: Hemisphere, 1985, p.1-28.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Fundamentals of Aquatic Toxicology: In: **Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. G. Rand, G. M., (ed.). Taylor & Francis, Washington, 1995, cap. 1.

READMAN, J. W. Development, occurrence and regulation of antifouling paint biocides: historical review and future trends. In: **Antifouling paint biocides**. I. KONSTANTINOOU, (ed.). Springer, Berlin Heidelberg, Germany, 2006. p. 1-16.

REID, D. G. The genus *Littoraria* Griffith & Pidgeon, 1834 (Gastropoda: Littorinidae) in the tropical eastern Pacific. *Veliger*, v.42, p. 21-53, 1999.

RHODES, O.E.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. (eds.). University of Chicago Press, Chicago, 1996, p. 281–317.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. In: **Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. G. C. MORALES (ed.). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004, cap. 2.

SANTOS, R. M. A.; ALMEIDA, C.; PEREIRA, M. L.; BARROSO, C. M.; OLIVEIRA, S. G. Morphological expression and histological analysis of imposex in *Gemophos viverratus* (Kiener, 1834) (Gastropoda: Buccinidae): a new bioindicator of tributyltin pollution on the West African coast. **Journal of Molluscan Studies**, v. 80, p. 412-419, 2014.

SCHVARTSMAN, S. 1991. Intoxicações agudas. Sarvier, São Paulo, 355p.

STEWART, C., DEMORA, S. J.; JONES, M. R. L.; MILLES, M. C. Imposex in New Zeland Neogastropods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, p. 204-209, 1992.

TELESH, I. V. Plankton of the Baltic estuarine ecosystems whit emphasis on Neva Estuary: a review of present knowledge and research perspectives. **Marine Pollution Bulletin**. v.49, p. 206:219. 2004.

TITLEY-O'NEAL, C. P.; MUNKITTRICK, K. R.; MACDONALD, B. A. The effects of organotin on female gastropods. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 13, p. 2360-2388. 2011.

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do banimento mundial da utilização de TBT em tintas antiincrustantes em 2008 (IMO), os resultados observados neste estudo registram pela primeira vez o uso deste organoestânico no litoral sul da Bahia através do indicador *Imposex* em *Stramonita rustica*, observado em 7 dos 8 pontos amostrais, com maiores frequências de alterações sexuais em áreas como portos, atividades de manutenção de pequenos embarcações e docas. As baixas frequências observadas estão relacionadas à menor sensibilidade desta espécie quando comparada com a congênere *S. haemastoma*.

O litoral da Bahia, com 1.110 km, é o mais extenso do Brasil, onde grande parte é ocupada por manguezais, o que torna os ambientes altamente explorados e alvos de contaminação ambiental. *Littoraria angulifera* (Caenogastropoda) é uma espécie neotropical que ocorre em florestas de mangue em ambos os lados do Oceano Atlântico e no Caribe, ocupando zonas de supralitoral e mediolitoral, sendo intimamente adaptada e associada ao sistema estuarino, e obedecendo aos critérios propostos para a escolha como organismo teste para contaminação ambiental. Dessa forma, foram analisadas a morfologia, o recrutamento e o comportamento de *L. angulifera*. Os resultados obtidos mostraram que essa espécie é conspícua nos manguezais e de fácil manuseio. Em locais mais antropizados, esta apresentou menor altura de concha em relação a populações de ambientes menos antropizados, reforçando o uso da espécie como bioindicadora. *Littoraria angulifera* apresentou recrutas ao longo da amostragem realizada, sugerindo reprodução contínua com picos reprodutivos nos meses mais quentes e diferenças morfométricas distintas entre os tratos genitais masculino e feminino, confirmadas através da biometria de 520 animais coletados ao longo de 13 meses de estudo. Para confirmação do ciclo reprodutivo e a duração da fase larval (apenas estimada até o momento), faz-se necessária a análise temporal da histologia das gônadas e a colheita de larvas no ambiente, para correlacionar aos dados de recrutamento e de morfometria do aparelho reprodutivo.

Uma vez conhecida a morfometria deste mesogastrópode e o efeito como disruptor endócrino do TBT, foi feita a comparação entre fêmeas juvenis e

adultas de um sítio (controle negativo) e também de controle negativo laboratorial, com fêmeas submetidas à contaminação com cloreto de tributilestano (TBTCl), através de dois bioensaios. Os dados mostraram que houve alteração na morfometria do aparelho genital feminino de ambos os estágios de vida e à menor concentração exposta, confirmando a sensibilidade de *L. angulifera* ao TBT. Os resultados dos experimentos foram significativamente semelhantes aos observados nos ambientes contaminados por TBT, como atracadouros (A1) e estaleiros (A2). O comprimento do oviduto palial das fêmeas de ambientes contaminados apresentou-se alongado, semelhante ao comprimento da próstata nos machos, gonoduto do sexo masculino. Outra biometria semelhante aos machos observada foi a distância entre a abertura genital das fêmeas ser mais próxima a abertura anal. Nos machos, a abertura prostática fica praticamente paralela ao ânus, aberta em forma de fenda no manto, por onde passa o esperma até o pênis. Por essa razão, esta fica mais próxima a abertura do opérculo, evitando a perda de gametas e garantindo maior eficiência reprodutiva. As fêmeas expostas ao TBT apresentaram a abertura da vulva mais próxima à abertura anal, como nos machos. Essa alteração pode comprometer a sobrevivência dos ovos, uma vez que eles são chocados entre as lamelas branquiais para depois serem liberados como larva véliger no ambiente. Dessa forma, os ovos já estariam mais próximos da abertura do opérculo, podendo ser liberados ainda imaturos na lâmina d'água. Essa alteração pode ser relacionada à masculinização dessas fêmeas, uma vez que reproduzem a morfometria do aparelho reprodutor masculino. Como proposição de metodologia, para a verificação do comprometimento reprodutivo, a indução a liberação de ovos/larvas pode ser realizada através de choques térmicos, em fase anterior à análise do aparelho reprodutivo.

Nas áreas coletadas, o número de animais também foi menor do que em ambientes não antropizados, o que pode estar associado a esta perda de eficiência reprodutiva devido ao TBT, entretanto, para inferir essa atribuição, torna-se necessária a realização de um biomonitoramento.

Para verificar a existência de outras alterações causadas pelo TBT à *L. angulifera*, é necessária a análise de outros órgãos que são via direta de absorção deste, como a glândula digestiva e a gônada. Dessa forma, torna-se necessário observar a variação morfológica, realizar a análise de tecidos e fazer a quantificação do contaminante em nível de órgãos e sistemas. Para a verificação de modificações comportamentais, sugere-se a realização de novos ensaios ecotoxicológicos que visem observar o comportamento dos animais expostos a ambientes contaminados e não contaminados por TBT.

A título de utilização de *L. angulifera* como organismo indicador para contaminação por TBT em ambientes estuarinos, ambas as classes de tamanho usadas nos ensaios mostraram-se sensíveis ao TBT, ou seja, apresentaram alterações na morfometria do aparelho reprodutivo. Já com relação à coleta, análise e manipulação dos animais pelo pesquisador, a altura de concha mais indicada/confortável é a de 19-20 mm, faixa em que os animais já possuem tecidos menos frágeis e mais resistentes ao manuseio.

Dessa maneira, foi possível confirmar, através da observação *in situ* e por ensaios, que o TBT provoca alterações na morfometria do aparelho reprodutivo de *L. angulifera*, que os parâmetros morfométricos aqui analisados foram válidos, evidenciando alterações morfológicas no trato genital feminino e por fim, que novos estudos relacionados à contaminação por TBT em ambientes estuarinos, utilizando *L. angulifera* e os parâmetros aqui propostos, serão importantes para a proposição final e responsável desta espécie como bioindicadora para contaminação por TBT em estuários.

APÊNDICE I

Classificação taxonômica de *Littoraria angulifera*

Reino: ANIMALIA

Filo: MOLLUSCA

Classe: GASTROPODA

Subclasse: CAENOGASTROPODA

Ordem: LITTORINIMORPHA

Superfamília: LITTORINOIDEA

Família: LITTORINIDAE

Subfamília: LITTORININAE

Gênero: *Littoraria*

Espécie: *L. angulifera*

Classificação taxonômica de *Stramonita rustica*

Reino: ANIMALIA

Filo: MOLLUSCA

Classe: GASTROPODA

Subclasse: CAENOGASTROPODA

Ordem: NEOGASTROPODA

Superfamília: MURICOIDEA

Família: MURICIDAE

Subfamília: RAPANINAE

Gênero: *Stramonita*

Espécie: *S. rustica*

APÊNDICE II

SUBCLASSE PROSOBRANCHIA

As características desta subclasse estão relacionadas com a condição de suas brânquias, localizadas anteriormente ao coração e ao padrão estreptonêurico do sistema nervoso. Também é característico que apresentam sexos separados (dióicos).

São animais de habitat marinho bêntico, embora haja representantes de água doce e terrestres. Apresentam cavidade do manto anterior e, na maioria das famílias, as espécies perderam o átrio direito e apresentam opérculo (RUPERT et al., 2005).

A subclasse era dividida em três ordens fundamentadas em um conjunto de estruturas e fenômenos de complexidade diferenciada, resultando em Archaeogastropoda, Mesogastropoda e Neogastropoda. Em 1960, a ordem Caenogastropoda foi introduzida por Cox, e as ordens citadas passaram a ser consideradas subordens (LEME, 1995).

A ordem Mesogastropoda possui cerca de 30.000 espécies, sendo a maioria marinha, mas apresentando indivíduos de água doce e terrestres. A maior parte é herbívora, mas alguns são parasitas ou predadores. A massa visceral localiza-se torcida em espiral na columela e o ctenídio, nefrídeo e osfradium localizam-se no lado esquerdo, apresentando transformações anatômicas adaptativas (LEME, 1995; RUPPERT et al., 2005).

A ordem Neogastropoda agrupa aproximadamente 25 famílias. Suas características anatômicas incluem o sistema digestivo anterior a probóscide, glândula de Leiblein, glândula salivar primária e acessória, glândula anal e inúmeras peculiaridades radulares (PONDER, 1973).

Os neogastrópodes possuem apenas uma aurícula, um rim e uma guelra monopectinata, isto é, os filamentos branquiais desenvolvem-se apenas de um lado do eixo central. A concha possui canal sifonal bem desenvolvido, formado a partir de uma dobra no manto e usado para aspirar a água para dentro da cavidade

do manto. Na base do sifão está o osfradium bipectinado (ramificação a partir de um eixo central), um receptáculo e órgãos sensoriais olfativos mais desenvolvidos que da Ordem Mesogastropoda. As alterações morfológicas incluem o alongamento do canal sifonal, a mudança na abertura de boca para uma posição terminal de cabeça e a formação de uma probóscide bem desenvolvida. O sistema nervoso é muito concentrado (STRONG, 2003).

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

PONDER, W. F. 1973. The origin and evolution of the Neogastropoda. *Malacologia*, v. 12, p. 295-338.

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

STRONG, E. E. 2003. Refining molluscan characters: morphology, character coding and a phlogeny of the Caenogastropoda. *Zoological Journal of the Linnean Society*. v. 137, p. 447-554.

Instruções aos autores - Brazilian Journal of Biology



Finalidade e normas gerais

O Brazilian Journal of Biology publica resultados de pesquisa original em qualquer ramo das ciências biológicas. Estará sendo estimulada a publicação de trabalhos nas áreas de biologia celular, sistemática, ecologia (auto-ecologia e sinecologia) e biologia evolutiva, e que abordem problemas da região neotropical.

A revista publica somente artigos em inglês. Artigos de revisões de temas gerais também serão publicados desde que previamente propostos e aprovados pela Comissão Editorial.

Informações Gerais: Os originais deverão ser enviados à Comissão Editorial e estar de acordo com as Instruções aos Autores, trabalhos que não se enquadrem nesses moldes serão imediatamente devolvidos ao(s) autor(es) para reformulação.

Os trabalhos que estejam de acordo com as Instruções aos Autores, serão enviados aos assessores científicos, indicados pela Comissão Editorial. Em cada caso, o parecer será transmitido anonimamente aos autores. Em caso de recomendação desfavorável por parte de um assessor, será usualmente pedida a opinião de um outro. Os trabalhos serão publicados na ordem de aceitação pela Comissão Editorial, e não de seu recebimento.

Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista.

Preparação de originais

O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais:

Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas.

O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

Nomes dos autores – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar e, y, and, et em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes.

Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustrações e tabelas) devem ser submetidos através da interface de administração do sistema de submissão da SciELO cujo endereço www.scielo.br/bjb (SUBMISSÃO-ONLINE).

Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre resumir resultados e conclusões.

Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação:

1ª página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço. Indicação do número de figuras existentes no trabalho. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso).

2ª página e seguintes – Abstract (sem título). Resumo: em português (com título); Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos.

Em separado - Referências, Legendas das figuras, Tabelas e Figuras.

As seguintes informações devem acompanhar todas as espécies citadas no artigo:

- Para zoologia, o nome do autor e da data de publicação da descrição original deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos;
- Para botânica e ecologia, somente o nome do autor que fez a descrição deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos.

O trabalho deverá ter, no máximo, 25 páginas, incluindo tabelas e figuras, em caso de Notes and Comments limitar-se a 4 páginas.

A seriação dos itens de Introdução e Agradecimentos só se aplicam, obviamente, a trabalhos capazes de adotá-la. Os demais artigos (como os de Sistemática) devem ser redigidos de acordo com critérios geralmente aceitos na área.

Referências Bibliográficas:

1. Citação no texto: Use o nome e o ano de publicação: Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar and Rocha, 2000); Zaluar and Rocha (2000). Se houver mais de dois autores, usar “et al.”

2. Citações na lista de referências devem estar em conformidade com a norma ISO 690/2010.

No texto, será usado o sistema autor-ano para citações bibliográficas (estritamente o necessário), utilizando-se “and” no caso de 2 autores. As

referências, digitadas em folha separada, devem constar em ordem alfabética. Nas referências de artigos de periódicos deverão conter nome(s) e iniciais do(s) autor(es), ano, título por extenso, nome da revista (por extenso e em itálico), volume, número, primeira e última páginas. Referências de livros e monografias deverão também incluir a editora e, conforme citação, referir o capítulo do livro. Deve(m) também ser referido(s) nome(s) do(s) organizador(es) da coletânea. Exemplos:

Livro:

LOMINADZE, D.G., 1981. Cyclotron waves in plasma. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

Capítulo de livro:

WRIGLEY, E.A., 1968. Parish registers and the historian. In: D. J. STEEL, ed. National index of parish registers. London: Society of Genealogists, pp. 15-167.

Artigo de periódico:

CYRINO, J.E. and MULVANEY, D.R., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line. *Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 517-525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000300017>. PMID: 10765463.

Dissertação ou tese:

LIMA, P.R.S., 2004. Dinâmica populacional da Serra *Scomberomorus brasiliensis* (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Trabalho apresentado em evento:

RANDALL, D.J., HUNG, C.Y. and POON, W.L., 2004. Response of aquatic vertebrates to hypoxia. In: Proceedings of the Eighth International Symposium

on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality, October 12-14, Chongqing, China. Athens, Georgia, USA: EPA, 2006, pp. 1-10.

Referência disponível online:

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS ANA, 2013 [viewed 4 February 2013]. Hidro Web: Sistema de Informações hidrológicas [online]. Available from: <http://hidroweb.ana.gov.br/>

A Revista publicará um Índice inteiramente em inglês, para uso das revistas internacionais de referência.

As provas serão enviadas aos autores para uma revisão final (restrita a erros e composição) e deverão ser devolvidas imediatamente. As provas que não forem devolvidas no tempo solicitado - 5 dias - terão sua publicação postergada para uma próxima oportunidade, dependendo de espaço.

Material Ilustrativo – Os autores deverão limitar as tabelas e as figuras (ambas numeradas em arábicos) ao estritamente necessário. No texto do manuscrito, o autor indicará os locais onde elas deverão ser intercaladas.

As tabelas deverão ter seu próprio título e, em rodapé, as demais informações explicativas. Símbolos e abreviaturas devem ser definidos no texto principal e/ou legendas.

Na preparação do material ilustrativo e das tabelas, deve-se ter em mente o tamanho da página útil da REVISTA (22 cm x 15,0 cm); (coluna: 7 cm) e a idéia de conservar o sentido vertical. Desenhos e fotografias exageradamente grandes poderão perder muito em nitidez quando forem reduzidos às dimensões da página útil. As pranchas deverão ter no máximo 30 cm de altura por 25 cm de largura e incluir barra(s) de calibração.

As ilustrações devem ser agrupadas, sempre que possível. A Comissão Editorial reserva-se o direito de dispor esse material do modo mais econômico, sem prejudicar sua apresentação.

Disquete – Os autores são encorajados a enviar a versão final (e somente a final), já aceita, de seus manuscritos em disquete. Textos devem ser preparados em Word for Windows e acompanhados de uma cópia idêntica em papel.

Recomendações Finais: Antes de remeter seu trabalho, preparado de acordo com as instruções anteriores, deve o autor relê-lo cuidadosamente, dando atenção aos seguintes itens: correção gramatical, correção datilográfica (apenas uma leitura sílaba por sílaba a garantir), correspondência entre os trabalhos citados no texto e os referidos na bibliografia, tabelas e figuras em arábicos, correspondência entre os números de tabelas e figuras citadas no texto e os referidos em cada um e posição correta das legendas.

Taxa de Publicação

Este periódico cobra apenas a seguinte taxa aos autores:

Custo por página diagramada R\$ 200,00 (vigência 2016).

ANEXO II

Instruções Aos Autores - Journal of Molluscan Studies



Information for Authors

INSTRUCTIONS FOR THE PREPARATION OF MANUSCRIPTS

SUBMISSION

Papers are considered on the understanding that their substance is not already published or being offered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted by email to the Editor (to email: jmollstud@nhm.ac.uk), but subsequent correspondence may be with an Associate Editor. Receipt will be acknowledged. All manuscripts will be peer reviewed before publication and authors are asked to suggest three independent potential referees for their work.

The initial submission should include both a Microsoft Word document (text and tables only) and a PDF file less than 10 MB in size (including text, tables, figures and supplementary material). Text should be formatted with continuous page and line numbers. Following acceptance, final submission should consist of a copy of all text material in Word and individual high-resolution electronic figures (see below for format).

Contributors are asked to follow these instructions closely. Failure to comply will cause delay and may lead to the return of the manuscript.

GENERAL PRESENTATION

Papers should be written in clear, concise English. Sentences should not begin with abbreviations or numerals.

The first page of the manuscript should consist of: title (upper and lower case); authors' names (upper and lower case) and their full postal address(es) (italics);

short running head (capitals); footnote with name and email address of corresponding author.

This should be followed by: Abstract (on separate page); main text; Acknowledgements; References; figure captions and tables (on separate pages). Indicate the approximate position of each figure and table in the margin of the text.

Hierarchy of headings should not normally exceed two: main headings (centred, capitals) and subsidiary headings (on the left, in italics). Do not number headings; avoid footnotes.

The main text should normally consist of: Introduction; Material and Methods; Results (or Systemic Descriptions); Discussion. Methodology must comply with national regulations governing experiments on living animals.

In the Acknowledgements external sources of funding for the costs of research and publication should be listed. Where appropriate, authors may also wish to acknowledge intellectual input from others (including reviewers), collection permits, research permissions and other forms of assistance.

Tables should be presented on separate pages, numbered with Arabic numerals and with the title (in the format: 'Table 1. List of localities.') at the top of the page. They should be referred to as 'Table 1', etc. in the text.

Abbreviations for statistical parameters include: P, n, SD, SE, df, ns.

SUPPLEMENTARY DATA

Supporting material that is not essential for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be made available by the publisher as online-only content, linked to the online manuscript.

The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that are additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include more detailed

methods, extended data sets/data analysis, or additional figures (including colour, which is published online-only at no charge to the authors).

All text and figures must be provided in suitable electronic formats. All material to be considered as Supplementary Data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication. Please indicate clearly the material intended as Supplementary Data upon submission. Also ensure that the Supplementary Data are referred to in the main manuscript where necessary.

NOMENCLATURE AND SYSTEMATIC DESCRIPTIONS

Italicize the names of genera, subgenera and species, but not those of higher taxa. When first mentioned, specific names that are the subject of the research should include the authority and date. Descriptions of new taxa and taxonomic revisions must comply with the International Code of Zoological Nomenclature. New taxa and nomenclatural acts should be registered with ZooBank (www.zoobank.org).

Headings for all taxonomic categories in taxonomic papers should be centred and in bold (including authorities and 'new species', etc.).

Subsidiary headings for taxonomic descriptions should be to the left and in italics, with text continuing on same line [e.g. ' *Anatomy* (Figs 2, 3): . . . ']. They should optimally include, in the following order: [Synonymy] this does not require a heading; Types; Etymology (for new taxa); Material examined; Diagnosis; Description (or separate headings for Shell, Radula, Anatomy, etc.); Distribution; Remarks.

Synonymies should be in 'condensed' format, i.e. each specific name followed through its various generic combinations in order of date of first usage, with subsequent references to the same genus + species following on chronologically, as in the example:

Turbo tricarinatus Wood, 1928: 20; pl. 4, fig. 7 (Botany Bay, Australia; holotype AMS 12998). Jones, 1998: 45.

Littorina tricarinata —Mørch, 1960: 99.

Littorina bifasciata Adams, 1952: 67 (no locality; types lost; neotype here designated BMNH 2356).

Reeve, 1990: 56 (in part).

Littorina nigra —Peterson, 1964: 43; pl. 12, fig. 3 (not Sowerby, 1832).

Diagnoses and descriptions must be given in 'telegraphic' style, unless full sentences are required for detailed explanations.

The final entry is an example of a misidentification, not the introduction of an available name. Note that a long dash must separate taxon and author except in the case of reference to the original description. Full references to the authors cited in synonymies (not including authors of homonyms) must appear in the final reference list at the end of the paper.

PUBLISHING ETHICS AND ANIMAL WELFARE

Journal of Molluscan Studies expects that authors will observe the highest standards with respect to publication ethics. For example, the following practices are unacceptable: (1) falsification or fabrication of data; (2) plagiarism, including duplicate publication of the authors' own work in whole or in part; (3) misappropriation of the work of others such as omission of qualified authors; (4) withholding information of relevance to assess possible conflicts of interest (e.g. financial support); (5) Failure to meet reasonable requests for access to data on which conclusions lie, etc. Allegations of unethical conduct will be discussed initially with the corresponding author. In the event of an unresolved dispute, the matter may be referred to the author's institution and funding agencies for investigation and adjudication.

The Journal applies plagiarism detection software (iThenticate) to submitted manuscripts and reserves the right to decline submissions suspected of plagiarism at any point during the assessment process. It will also retract articles found to violate plagiarism guidelines after publication. In addition, the Journal reserves

the right to report any suspicion of plagiarism to the senior author's institution. Oxford University Press, publisher of *Journal of Molluscan Studies*, is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) and the Journal adheres to the COPE code of conduct and guidelines for authorship .

Authors must adhere to international guidelines and standards for the ethical use of animals in research, the legal requirements of the country in which the work was carried out, and any institutional guidelines. Such regulations often make explicit provision for treatment of cephalopods. If applicable, authors should state (within the Methods section) the name of the local and/or national body that grants approval for the use of animals in research and the reference number for animal ethics approval of the protocols applied in the work. If ethical considerations arose in the course of the study, the author should describe in the manuscript how those considerations were addressed.

REFERENCES

References in the text should take one of the following forms:

'Nisbet (1973) said ...'

or '... (Nisbet, 1973) ...'

or '... (Merdsoy & Farley, 1973; Nisbet, 1973; Anderson, 1980) ...'

Do not use 'loc cit.'. The first time a paper with up to three authors is referred to, give all the authors' names; thereafter use the form X et al. ; for papers with four or more authors use et al. throughout.

References are listed alphabetically; the styles of entry to be used are:

ANSELL, A.D. & TREVAILLION, A. 1970. Brood protection in the stenoglossan gastropod *Bullia melanoides* (Deshayes). *Journal of Natural History*, 4: 369–374.

DUNCAN, C.J. 1975. Reproduction. In: *Pulmonates*, Vol. 1 (V. Fretter & J.F. Peake, eds), pp. 309–365. Academic Press, London.

ELLIS, A.E. 1926. *British snails*. Clarendon Press, Oxford.

NISBET, R.H. 1973. The role of the buccal mass in the trochid. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 40: 435–468.

RUNNEGAR, B. & POJETA, J. 1985. Origin and diversification of the Mollusca. In: *The Mollusca, Vol. 10: Evolution* (E.R. Trueman & M.R. Clarke, eds), pp. 1–57. Academic Press, London.

THORSON, G. 1958. Parallel level bottom communities, their temperature adaptation, and their "balance" between predators and food animals. In: *Perspectives in marine biology* (A.A. Buzzati-Traverso, ed.), pp. 67–86. University of California Press, Berkeley.

Journal titles are printed in italics and cited in full with the volume number in bold.

If you use EndNote and/or Reference Manager to facilitate referencing citations (not required for submission), this journal's style is available for use.

RESEARCH NOTES

Short manuscripts (no longer than six double-spaced pages of text) that require rapid publication can be submitted as Research Notes. They are normally methodological notes or on subjects of exceptional interest.

There should be no headings and no abstract; acknowledgements should be brief. The title should be in bold lower-case type, the authors' names in upper-case and their addresses in italics.

References should be cited as in full papers.

COMMENT AND RESPONSE

This provides the opportunity for a short critique of a Research Paper recently published in the Journal. The Comment should be brief (normally less than 1000 words), have no abstract and contain no more than ten references. It will be subject to full peer review; if accepted for publication, it will be forwarded to the

corresponding author of the original paper, who will be given the opportunity to respond in the form of a brief Response. Any trivial points of difference or misunderstanding should be resolved by direct correspondence with the corresponding author of the original paper; this correspondence must be submitted in a cover letter accompanying the Comment article.

ILLUSTRATIONS

All illustrations should be referred to in the text as 'Figures' (or, if in parentheses, as 'Fig.' or 'Figs') and numbered in a single series with Arabic numerals. (Note that figures in another work are referred to as 'fig.' or 'figs'.)

Colour figures will be printed at the authors' expense at a cost of £250 plus VAT per colour figure. If colour reproduction is considered essential for the subject of the paper, this cost may be waived (by arrangement with the Editor in Chief). Colour figures in the online version and in Supplementary Material are free of charge.

Electronic images can be accepted in the following formats:

- (1) Editable EPS files (resolution should be a minimum of 300 dpi)
- (2) Editable Word or Powerpoint files (image files embedded into Word or Powerpoint are often not good quality).
- (3) Native application file formats (that is the original application e.g. Powerpoint files).
- (4) High resolution PDF. We can accept figures in PDF format. But, it is important to choose the correct job option (e.g. high quality print) in the distiller so that figure is of high quality.
- (5) High resolution Tiff, preferably with LZW image compression (check settings while exporting to Tiff from the original application). The image resolution we require is minimum of 300 dpi; text and the images have to be sharp.

Colour figures must be saved as CMYK colour not RGB.

Illustrations should be supplied at the size they are to appear in print and prepared so that they fit into a single column (85 mm wide), or across the breadth of the page (175mm wide), or occupy a full page (235 mm deep x 175 mm wide). In all cases sufficient allowance must be made for the figure caption to appear beneath a figure. All figures must be prepared to a standard ready for publication.

Illustrations must each carry a scale bar and not magnifications in the figure captions.

Lettering should be in a sans-serif font (e.g. Helvetica or Arial), with final printing size no more than 3 mm. Each component of a composite figure should be given a capital letter; labels and abbreviations should be in lower-case letters.

Captions for figures should be grouped together in sequence and placed at the end of the paper. The caption format for composite figures should be, for example:

Figure 1. *Littorina littorea* . A. Pallial oviduct. B. Penis. Abbreviations: a, albumen gland; b, bursa; sg, sperm groove. Scale bars: A = 2.0 mm; B = 1.0 mm.

Permissions

In order to reproduce any third party material, including figures or tables, in an article authors must obtain permission from the copyright holder and be compliant with any requirements the copyright holder may have pertaining to this reuse.

When seeking to reproduce any kind of third party material authors should request the following:

- (i) non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal;
- (ii) electronic rights, preferably for use in any form or medium;
- (iii) the right to use the material for the life of the work; and

(iv) world-wide English-language rights.

Further guidelines on clearing permissions can be found at: http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/permissions_guidelines.doc .

Authors should also include a statement indicating that permission has been obtained in the relevant legend/footnote and provide the Editorial Office with copies of any relevant paperwork.

A template permissions request letter can be found at the end of the above document.

Third-Party Content in Open Access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

PROOFS, OFFPRINTS AND COPYRIGHT

A link to the proofs in our online system will be sent (by email) to the corresponding author only; it is assumed that only printer's errors and factual mistakes will be corrected. More extensive alterations will be charged to the author.

Details of free online access will be sent to the corresponding author, who may then circulate them to co-authors. If the purchase of offprints is required, a completed offprint order form must be returned with the proofs. Late orders submitted after the journal is in press are subject to increased prices.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number.

Please download the form at http://www.oxfordjournals.org/our_journals/mollus/for_authors/offprint.pdf and complete the form to place an order.

It is a condition of publication in the Journal that authors grant an exclusive licence to the Journal of Molluscan Studies. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will allow the article to be as widely disseminated as possible. As part of the licence agreement, authors may use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

OPEN ACCESS OPTION FOR AUTHORS

Journal of Molluscan Studies authors have the option to publish their paper under the Oxford Open initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open

access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences. Authors publishing in the Journal of Molluscan Studies can use the following Creative Commons licence for their articles:

- Creative Commons Attribution licence (CC BY)

Please click [here](#) for more information about the Creative Commons licences.

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. The open access charges applicable are:

Regular charge - £1850/ \$3000 / €2450

Reduced Rate Developing country charge* - £925 / \$1500 / €1225

Free Developing country charge * - £0 / \$0 / €0

*Visit our [Developing Countries](#) page for a list of qualifying countries.

Please note that these charges are in addition to any colour/page charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution, and ensure you account for your own local VAT correctly.

SELF-ARCHIVING AND ACCEPTED MANUSCRIPT POLICY

Authors may deposit the accepted manuscript of their article into PubMedCentral, other subject repositories or institutional repositories, but must stipulate that public availability be delayed until 12 months after the first online publication. For further details of this policy please visit: [Author Self-archiving Policy](#).

LANGUAGE EDITING

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers is optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please [click here](#). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

CROSSREF FUNDING DATA REGISTRY

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources in the manuscript. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please [click here](#).

ANEXO III

INSTRUÇÕES AOS AUTORES*

(Atualizado em fevereiro de 2017)

***As normas do Boletim do Instituto de Pesca podem sofrer alterações. Portanto, não deixe de consultá-las antes de fazer a submissão de um novo artigo ou nota.**

O *BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA (BIP)*, ISSN 0046-9939 (impresso) e ISSN 1678-2305 (*online*), site: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>, está classificado atualmente no WEBQUALIS como **B1** nas áreas de Zootecnia e Recursos Pesqueiros, Ciências Ambientais e Ciências de Alimentos; e como **B2** em: Medicina Veterinária e Ciências Agrárias I. Seu índice de impacto no JCR é 0,525.

Os arquivos eletrônicos contendo o original e demais documentos necessários devem ser encaminhados ao *Comitê Editorial do Instituto de Pesca*, pelo e-mail: ceipboletim@gmail.com

O BIP é destinado à publicação de documentos originais (artigos científicos e notas científicas), que contribuam para a ampliação do conhecimento nas áreas de pesca (tecnologia de pesca, biologia pesqueira, sociologia e economia pesqueiras), aquicultura, limnologia, ecologia aquática, tecnologia e sanidade do pescado e patologia de organismos aquáticos.

É publicado um volume por ano, com o pertinente número de fascículos.

O processo de avaliação utilizado pelo *Comitê Editorial do Instituto de Pesca* é o sistema por pares “blind review”, ou seja, sigilo sobre a identidade, tanto dos autores quanto dos revisores, que será mantido durante todo o processo.

O periódico também aceita e incentiva submissões de artigos redigidos em inglês ou espanhol. Em caso de autores não nativos de países que falem estas línguas, o artigo deverá ser revisado por um especialista que o próprio *Comitê Editorial do Instituto de Pesca* poderá indicar.

Todo trabalho submetido ao Boletim será avaliado preliminarmente pelo Comitê Editorial e, se superar essa primeira triagem, será enviado, inicialmente, para dois

revisores especialistas na área abordada. A publicação se dará somente com a aprovação do documento pelos revisores, cabendo ao *Comitê Editorial do Instituto de Pesca* a decisão final do aceite.

A seleção dos artigos será baseada na originalidade, qualidade e mérito científico.

O Comitê Editorial tomará o cuidado para que os revisores de cada artigo sejam, obrigatoriamente, de instituições distintas daquelas de origem dos autores.

O Boletim do Instituto de Pesca tem uma política de rastreamento por plágio, assim sendo, artigos que forem detectados serão automaticamente negados e devolvidos. Caso seja detectado a posteriori o artigo será despublicado.

As opiniões emitidas nos trabalhos são de exclusiva responsabilidade de seus autores.

O Boletim do Instituto de Pesca reserva-se o direito de realizar pequenas adaptações nos originais visando manter a uniformidade da publicação.

Tipos de documentos publicáveis no BIP

Artigo Científico

Trabalho resultante de pesquisa científica, **apresentando dados originais** obtidos de forma planejada, com base em métodos cientificamente aceitos, rigorosamente controlados e com planejamento estatístico adequado, que possam ser replicados e generalizados. A discussão deve ser criteriosa, com base científica sólida; não deve se limitar a comparações dos resultados com a literatura, mas apresentar inferências, hipóteses e argumentação sobre o que foi estudado.

Nota Científica

Comunicação curta de fato inédito resultante de pesquisa científica, cuja divulgação imediata se justifica, mas com informações insuficientes para constituir um artigo científico. Incluem-se nesta categoria a descrição de uma técnica, o registro da descoberta de uma nova espécie, observações e levantamentos de resultados de experimentos que não podem ser repetidos, e outras situações únicas. Deve ter o mesmo rigor de um Artigo Científico e conter os elementos necessários para avaliação dos argumentos apresentados.

PROCEDIMENTOS EDITORIAIS

Custo de publicação

O custo é de R\$ 40,00 (quarenta reais) por **página final editorada** para publicação. No ato da submissão é requerido um depósito de R\$ 100,00 (cem reais) **não reembolsáveis**, mas deduzido do custo final dos artigos aprovados.

Os depósitos ou transferências deverão ser efetuados em nome da FUNDAG, no Banco do Brasil: agência 3360-X – conta corrente 4200-5, **código de identificação do depósito: 1161**. O comprovante de depósito ou transferência deve ser enviado para o e-mail do Comitê Editorial (ceipboletim@gmail.com). Para que não seja paralisado o processo de avaliação do trabalho e emissão de recibo de pagamento da FUNDAG, enviar os seguintes dados: Nome, CPF, telefone e endereço completo (incluir o bairro e o CEP). Sem a identificação do autor do depósito, o processo de avaliação do trabalho não será iniciado.

Submissão de trabalho

O trabalho deverá ser enviado **via e-mail**, devidamente identificado, **em arquivo do WORD**.

Em trabalhos que envolvam a manipulação de vertebrados deve ser encaminhado um atestado de que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição de origem da pesquisa.

Após a aprovação do trabalho, deverá ser encaminhado ao Comitê Editorial o documento **Cessão de Direitos Autorais e Autorização para Publicação em Meio Eletrônico**, contendo apenas a assinatura do autor responsável pela submissão do trabalho, e cujo modelo está em: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>.

Avaliação do trabalho

1. O trabalho submetido será em primeira instância avaliado pelo *Comitê Editorial*.
2. Após aprovação preliminar pelo *Comitê Editorial*, e segundo a ordem cronológica de recebimento, o trabalho será enviado a no mínimo dois revisores de reconhecida competência no assunto abordado. Em seguida, se necessário, retornará ao(s) autor(es) para modificações/correções. O retorno do texto poderá ocorrer mais de uma vez, se assim o(s) revisor(es) solicitar(em).
3. O trabalho será aceito para publicação se tiver dois pareceres favoráveis, ou rejeitado quando pelo menos dois pareceres forem desfavoráveis. No caso de pareceres contraditórios entre os revisores, o trabalho será enviado a um terceiro revisor.
4. O trabalho aceito retornará ao(s) autor(es) para ultimar eventuais alterações

propostas e realizar rigorosa revisão, antes que o documento seja submetido ao processo de editoração e formatação ao estilo do Boletim. O prazo para devolução dessa versão final revisada será de sete dias.

ATENÇÃO: se o trabalho for rejeitado na avaliação prévia do Comitê Editorial (por inadequação às normas do BIP, por não se enquadrar no escopo temático da revista, por problemas redacionais [impropriedades linguísticas, morfológicas ou sintáticas] ou por falta de qualidade técnica) ou na avaliação final dos revisores “ad hoc”, o depósito não será devolvido, nem poderá ser reutilizado para outras submissões dos autores.

Disposições finais

Casos omissos serão avaliados pelo *Comitê Editorial do Instituto de Pesca*.

FORMATAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Instruções gerais

O trabalho deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, de acordo com a seguinte formatação: fonte Book Antiqua, tamanho 11; espaçamento entre linhas: 1,5; tamanho da página: A4; margens esquerda e direita: 2,5 cm; margens superior e inferior: 3,0 cm; número máximo de páginas, incluindo Figura(s) e/ou Tabela(s) e Referências: Artigo Científico: até 25 páginas; Nota Científica: até 15 páginas. As **linhas devem ser numeradas sequencialmente, da primeira à última página**. As páginas também devem ser numeradas. As notas de rodapé devem estar no texto.

Estrutura de Artigo Científico

A estrutura para o Artigo Científico é a seguinte: Título, Autor(es), Endereços institucionais (completos) e eletrônicos, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional), Referências.

O Título, o Resumo e as Palavras-chave devem ser traduzidos para o inglês, no caso de

artigos redigidos em português ou espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês ou espanhol.

Os termos: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências devem ser alinhados à esquerda e grafados em letras maiúsculas e em negrito.

TÍTULO

Deve ser claro e conciso (não deve se estender por mais do que duas linhas ou dez palavras), redigido em português e inglês ou, se for o caso, em espanhol, inglês e português. Deve ser grafado em letras maiúsculas e centralizado na página. No caso de trabalho desenvolvido com auxílio financeiro, informar na primeira página qual o agente financiador, indicado com asterisco, também apostado ao final do título. Recomenda-se que não seja inserido o nome científico da espécie e a referência ao seu descritor, a não ser que seja imprescindível (no caso de espécies pouco conhecidas).

NOME DO(S) AUTOR(ES)

Deve(m) ser apresentado(s) completo(s) e na ordem direta (prenome e sobrenome), com apenas o sobrenome pelo qual o(s) autor(es) deve(m) ser identificado(s) em caixa alta. A filiação do(s) autor(es), bem como um endereço completo para correspondência e um e-mail deverão ser colocados na primeira página, logo após o nome dos autores, sendo identificado(s) por números arábicos, separados por vírgula quando necessário.

Obs: Não serão aceitos trabalhos com mais de seis autores

RESUMO e Palavras-chave

O Resumo deve conter concisamente os objetivos, a metodologia, os resultados obtidos e as conclusões, utilizando no máximo 200 (duzentas) palavras. Deve ser redigido de forma que o leitor se interesse pela leitura do trabalho na íntegra.

Palavras-chave: no mínimo três (3) e no máximo seis (6), redigidas em letras minúsculas e separadas por ponto e vírgula. Não devem repetir palavras que constem do Título e devem identificar o assunto tratado, permitindo que o artigo seja encontrado no sistema eletrônico de busca.

ABSTRACT e Key words

Devem ser estritamente fiéis ao Resumo e Palavras-chave.

INTRODUÇÃO

Deve ocupar, preferencialmente, no máximo duas páginas, apresentando o problema científico a ser solucionado e sua importância (justificativa para a realização do trabalho), bem como a evolução/situação atual do assunto pesquisado. O último parágrafo deve expressar o objetivo, sendo coerente com o que consta no Resumo.

MATERIAL E MÉTODOS

Deve descrever sucintamente toda a metodologia utilizada, organizada de preferência na ordem de aplicação e de modo que o experimento possa ser reproduzido. Este item pode variar de acordo com a natureza temática do documento, mas em geral deve conter a descrição do procedimento amostral local, frequência, período, instrumento e métodos, outras variáveis relevantes ou o delineamento do experimento, a descrição dos tratamentos e das variáveis, o número de repetições e as características da unidade experimental. Deve informar sobre procedimentos estatísticos e transformações de dados. Deve-se evitar detalhes supérfluos, extensas descrições de técnicas de uso corrente e a utilização de abreviaturas não usuais.

RESULTADOS

Os Resultados devem ser apresentados em separado da Discussão. E isto pode ser feito textualmente ou sob a forma de Tabelas e/ou Figuras. Dados apresentados em Tabelas ou Figuras não devem ser repetidos sistematicamente no texto.

Tabelas:

Devem ser numeradas com algarismos **arábicos** e encabeçadas pelo Título (autoexplicativo). Recomenda-se que os dados apresentados em tabelas não sejam repetidos em gráficos, a não ser quando absolutamente necessário. As tabelas devem ter, no máximo, 16 cm de largura. As tabelas devem ser em formato “retrato” e não ultrapassar uma página. Abreviaturas também devem ser evitadas, a não ser para unidades de medida. Se necessárias, porém, devem ter seu significado indicado em legenda sob a tabela.

Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotos):

Devem ter, **no máximo**, 16 cm de largura e 21 cm de altura, ser numeradas com algarismos arábicos, com título autoexplicativo logo abaixo. Palavras em gráficos e mapas devem estar em fonte legível. Não inserir gráficos, mapas ou fotos em tabelas ou quadros. Os gráficos não devem ter linhas de grade nem margens.

Tabelas e figuras devem ser inseridas no item mais apropriado no transcorrer do texto. Os originais de desenhos, mapas e fotos devem ser enviados em arquivos distintos, preferencialmente em formato digital “tif” ou “jpeg, e permitir redução para 16 cm ou 7,5 cm de largura **sem perda de definição**.

DISCUSSÃO

A Discussão deve ser elaborada e não apenas uma comparação dos dados obtidos com os disponíveis em literatura. Deve focar e demonstrar as principais ideias e contribuições trazidas pelo trabalho, bem como comentar se há necessidade de novas pesquisas ou sobre eventuais limitações encontradas. Evitar repetir números já constantes dos resultados. A Discussão deve conter hipóteses e/ou comentários objetivos sobre os resultados, discutidos à luz de observações constantes da literatura especializada.

CONCLUSÃO

A Conclusão deve ser clara, concisa e responder ao objetivo do estudo. Deve, idealmente, ser capaz de propor uma solução (ou caminho de solução) para a demanda/problema, com base nos resultados obtidos.

AGRADECIMENTOS (opcional)

Devem ser sucintos, dirigidos a Instituição ou pessoa que tenha efetivamente colaborado para a realização do trabalho. De preferência, não deve ultrapassar cinco linhas.

Estrutura de Nota Científica

A Nota Científica deve seguir ordenação similar à de um Artigo Científico, contendo Título, Autor, Endereços institucional e eletrônico, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultado(s) e, eventualmente, Discussão, Agradecimento(s) (opcional) e Referências. Resultados e Discussão, neste caso, podem ser apresentados como item único.

A formatação segue o mesmo padrão, mas com no máximo 15 páginas (incluindo tabelas e figuras).

Obs: Não serão aceitos trabalhos com mais de seis autores

REFERÊNCIAS (normas para TODOS os tipos de publicação)

Devem ser apresentadas em ordem alfabética do sobrenome dos autores, sem numeração.

Devem conter os nomes de todos os autores, ano de publicação, o título do artigo (por extenso) e do periódico (também por extenso), número do volume e/ou edição e número e/ou intervalo de páginas.

A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido citados no texto são de responsabilidade do autor.

Dissertações e teses devem ser evitadas como referências. Porém, aceita-se quando absolutamente necessárias, mas devem estar disponíveis *on-line*.

Trabalhos de conclusão de graduação e resumos apresentados em congressos não são referências válidas.

Observação: inadequações nas referências também acarretarão a recusa do trabalho e a não devolução da taxa de submissão.

Como fazer citações no texto

Usar o sistema autor/data, ou seja, o sobrenome do autor em letras **maiúsculas** e o ano em que a obra foi publicada. Exemplos:

* para um autor: "MIGHELL (1975) observou..."; "Segundo AZEVEDO (1965), a piracema..."; "Estas afirmações foram confirmadas em trabalhos posteriores (WAKAMATSU, 1973)".

* para dois autores: "RICHTER e EFANOV (1976) pesquisando..." Se o artigo que está sendo submetido estiver redigido em português, utilizar "e" ligando os sobrenomes dos autores. Se estiver redigido em inglês utilizar "and" (RICHTER and EFANOV, 1976), se em espanhol, utilizar "y" (RICHTER y EFANOV, 1976).

* para três ou mais autores: o sobrenome do primeiro autor deve ser seguido da expressão "*et al.*" (*grafada em itálico*). Exemplo: "SOARES *et al.* (1978) constataram..." ou "Tal fato foi constatado na África (SOARES *et al.*, 1978)."

* para o mesmo autor, em documentos de anos diferentes, respeitar a ordem cronológica, separando os anos por vírgula. Exemplo: "De acordo com SILVA (1980,

1985)...”

* para citação de vários autores sequencialmente, respeitar a ordem cronológica do ano de publicação e separá-los por ponto e vírgula. Exemplo: “...nos viveiros comerciais (SILVA, 1980; FERREIRA, 1999; GIAMAS e BARBIERI, 2002)...”

* quando for **ABSOLUTAMENTE** necessário se referir a um autor, ainda que não em razão de uma consulta direta ao trabalho por ele publicado, o nome desse autor deve ser citado em letras minúsculas apenas no texto, indicando-se logo a seguir, entre vírgulas e precedido da palavra latina *apud*, o nome do autor e ano do trabalho efetivamente consultado no qual aparece a referência ao autor não diretamente lido. Ex.: “Segundo Gulland, *apud* SANTOS (1978), os coeficientes...”.

Como fazer citações na listagem de REFERÊNCIAS

1. DE DOCUMENTOS IMPRESSOS

Artigos científicos são listados como segue:

BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V.; DE MELO, C.B.; HENRIQUES, M.B. 2014 Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture Research*, 47(4): 1260-1268.

As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor principal. Havendo mais de uma obra com o mesmo sobrenome, considera-se a ordem cronológica e, persistindo a coincidência, a ordem alfabética do terceiro elemento da referência.

Recordando, após o nome dos autores, inserir o ano da publicação, o título do artigo, o título do periódico (em *itálico*; e que, repetindo, **NÃO DEVE SER ABREVIADO**), o volume (também em *itálico*), o fascículo (entre parênteses) e o número/intervalo de páginas.

A citação de dissertação e tese, tipos de documentos que se pode utilizar apenas quando **ABSOLUTAMENTE** necessário e se estiver disponível *on line*, deve ser feita como segue:

BERNADOCHI, L.C. 2012 *Captação de sementes em coletores artificiais e cultivo da ostra perliífera *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteriidae)*, São Paulo, Brasil. São Paulo. 75f. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca, APTA). Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/dissertacoes.pg.php>> Acesso em: 22 ago. 2014.

Para livro, também utilizado apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário, a citação deve ser:

GOMES, F.P. 1978 *Curso de estatística experimental*. 8ª ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 430p.

ENGLE, R.F.; GRANGER, C.W.J. 1991 *Long-run economic relationship: readings in cointegration*. New York: Oxford University Press. 301p.

NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D’ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford. 544 p.

Capítulo de livro ou publicação em obra coletiva, cita-se:

MORAES-VALENTI, P.; VALENTI, W.C. 2010 Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D’ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley-Blackwell, Oxford. p. 485-501.

Leis, Decretos, Instruções Normativas e Portarias são incluídas na listagem como segue:

BRASIL, 1988 CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de outubro de 1988, nº. 191-A, Seção 1, p. 1.

BRASIL, 2000 LEI nº. 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o Art. 225, § 1º, incisos I, II, III, e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de julho de 2000, nº. 138, Seção 1: p. 45.

BRASIL, 1990 DECRETO nº. 98.897, de 30 de janeiro de 1990. Dispõe sobre as reservas extrativistas e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 de janeiro de 1990, nº. 22, Seção 1, p. 2.

BRASIL, 2007 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº. 02, de 18 de setembro de 2007. Disciplina as diretrizes, normas e procedimentos para formação e funcionamento do

Conselho Deliberativo de Reserva Extrativista e de Reserva de Desenvolvimento Sustentável. *Diário Oficial da União*, 20 de setembro de 2007, nº. 182, Seção 1, p. 102.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2010b PORTARIA nº. 77, de 27 de agosto de 2010. Cria o Conselho Deliberativo da Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo/RJ. *Diário Oficial da União*, Brasília, 01 de setembro de 2010, nº. 168, Seção 1: p. 69.

2. DE MEIOS ELETRÔNICOS (periódicos publicados exclusivamente *on line*; documentos consultados *online* e em CD-ROM)

Exemplos:

LAM, M.E.; PAULY, D. 2010 Who is right to fish? Evolving a social contract for ethical fisheries. *Ecology and Society*, 15(3): 16. [online] URL: <<http://www.ecologyandsociety.org/vol15/iss3/art16/>>

CASTRO, P.M.G. (sem data, *on line*) A pesca de recursos demersais e suas transformações temporais. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/textos.php>> Acesso em: 3 set. 2014.

TOLEDO PIZA, A.R.; LOBÃO, V.L.; FAHL, W.O. 2003 Crescimento de *Achatina fulica* (gigante africano) (Mollusca: Gastropoda) em função da densidade de estocagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 55, Recife, 14-18 jul./2003. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 1 CD-ROM.

INSTRUÇÕES COMPLEMENTARES

1. Fórmula, expressão e equação matemática

As fórmulas, expressão e equação matemática devem ser inseridas no texto (não utilizar figura). Exemplo: $TE = (N/F_m) \times 100$.

2. Unidade de medida

Deve ser apresentada segundo o Sistema Internacional de Unidades (SI). Exemplo: 10 m²; 100 peixes m⁻¹; 20 t ha⁻¹.

3. Número de casas decimais

Deve ser padronizado para todo o texto. Por exemplo, grafado o comprimento dos exemplares amostrados com uma casa decimal, em todo o texto os valores referentes a esse parâmetro devem ser grafados com uma casa decimal.

4. Anexo e apêndice

Devem ser suprimidos anexos e apêndices.

* * * * *