

**Universidade Federal do Rio Grande – FURG**

**Instituto de Oceanografia**

Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica

**INFLUÊNCIA DE FATORES BIOLÓGICOS E  
AMBIENTAIS NA ACUMULAÇÃO DE  
TRIBUTILESTANHO (TBT) E  
DESENVOLVIMENTO DE IMPOSEX EM  
GASTRÓPODES BIOINDICADORES**

**MARTINA ROSSATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor

Orientadora: *Profa. Dra.* GRASIELA LOPES LEÃES PINHO  
Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.

Rio Grande, RS, Brasil

Junho de 2017

# **GASTRÓPODES COMO BIOINDICADORES DA POLUIÇÃO POR ORGANOESTÂNICOS: POSSÍVEIS FATORES QUE INFLUENCIAM NA ACUMULAÇÃO DOS COMPOSTOS E INDUÇÃO DO IMPOSEX**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física,  
Química e Geológica, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de  
Doutor

por

**MARTINA ROSSATO**

Rio Grande, RS, Brasil

Junho de 2017

© A cópia parcial e a citação de trechos desta tese são permitidas sobre a condição de que qualquer pessoa que a consulte reconheça os direitos autorais do autor. Nenhuma informação derivada direta ou indiretamente desta obra deve ser publicada sem o consentimento prévio e por escrito do autor.

ROSSATO, MARTINA

Gastrópodes como bioindicadores da poluição por organoestênicos: possíveis fatores que influenciam na acumulação dos compostos e indução do imposex./ Martina Rossato. – Rio Grande: FURG, 2017. 129 p .

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande. Doutorado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Área de Concentração: Oceanografia Química.

1. Autorradiografia. 2. Bioacumulação. 3. Biologia reprodutiva. 4. Biomonitoramento. 5. *Buccinum undatum* 6. Ciclo reprodutivo. 7. Imposex 8. *Stramonita brasiliensis*. 9. Sensibilidade. 10. Tributilestanho I. Gastrópodes como bioindicadores da poluição por organoestênicos: possíveis fatores que influenciam na acumulação dos compostos e indução do imposex.

# Ata da Defesa

# Agradecimentos

Agradeço à CAPES e ao CNPq/Ciências Sem Fronteiras, pelo auxílio financeiro tanto aqui no Brasil como durante o período do doutorado sanduíche no Canadá.

Agradeço aos professores que tive ao longo de toda minha formação na FURG. Em especial ao profe. Gilberto Fillmann e às aulas sobre Poluição Marinha, onde acabei encontrando meu lugar dentro da Oceanologia.

À todo pessoal que passou pelo laboratório CONECO ao longo desses 9 anos, desde minha graduação até hoje. Em especial à Aline Sartório, pela companhia nas empreitadas até o Farol de Santa Marta/SC e por toda ajuda na avaliação do ciclo reprodutivo. Ao Rodrigo e à Luydia, que também me acompanharam nas indiidadas até o Farol. E à Vanda Artifon, pela companhia no laboratório e pela imensa ajuda na realização do experimento com matéria orgânica.

Ao Ítalo Castro e à Mércia Barcellos, por estarem sempre prontos pra me ajudar, de perto ou de longe, de todas as maneiras possíveis. Fico feliz por termos um artigo juntos e imensamente grata por participarem da minha banca de avaliação e contribuírem para finalização deste trabalho.

Agradeço ao Claude Rouleau, por propiciar uma experiência profissional inesquecível, pela paciência e pelo entusiasmo ao realizarmos o experimento com radioativos.

Agradeço imensamente e do fundo do coração à minha orientadora, minha mãezinha-científica, a profa. Grasiela Pinho. Por todo apoio, sempre e em qualquer situação. Por ser orientadora, incentivadora, encorajadora e por toda compreensão que teve comigo e com todas as

situações que aconteceram nesses anos todos. Torço pra que a vida nos permita muito mais trabalhos juntas!

Agradeço sempre, todos os dias, os amigos e a vida que a Oceanologia e o Cassino me trouxeram. Alguns ainda por perto, outros longe há tanto tempo, mas sempre morando dentro do coração.

Agradeço com o coração cheio de amor, à minha família, meus pais e meu irmão, e não tem nem como dizer pelo que é o agradecimento. Agradeço por tudo. Pela vida, pela confiança, pela segurança, pelo encorajamento... por nunca medirem esforços para que eu alcançasse esse objetivo! Muito obrigada.

E minha gratidão transborda para agradecer ao amor da minha vida, por me permitir compartilhar todos os dias contigo. Por me acompanhar sempre. Por ser minha calma e meu aconchego! Que sorte eu tenho! Mais ainda, porque desse amor imenso, ganhei meu maior título, entregue pela pessoa mais importante do mundo, um menino lindo, com cachinhos dourados que me chama de mamãe.

Chego ao final do doutorado com uma sensação boa, de que minhas decisões e minha persistência me levaram aonde eu queria. Dizem que a felicidade não está na chegada, mas no caminho... pois bem, caminhei bem feliz até aqui!

Que assim continue...

# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>I</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>V</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>IX</b>
<b>Resumo gráfico .....</b>	<b>X</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XI</b>
<b>Capítulo I: Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo II: Hipótese.....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo III: Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>Capítulo IV: Material e Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Elucidar o ciclo reprodutivo do gastrópode <i>Stramonita brasiliensis</i> .....</b>	<b>20</b>
4.1.1. Coletas mensais .....	20
4.1.2. Análise macroscópica.....	20
4.1.3. Análises histológicas .....	21
4.1.4. Determinação dos níveis de hormônios esteroides.....	21
4.1.5. Parâmetros biofisiológicos.....	22
4.1.6. Análise estatística.....	22
<b>4.2. Verificar se a sensibilidade de <i>Stramonita brasiliensis</i> ao TBT varia de acordo com o período do ciclo reprodutivo, o tamanho dos organismos e se há diferença de sensibilidade entre organismos de diferentes populações do sudeste e sul do Brasil.....</b>	<b>23</b>
4.2.1. Locais de coleta.....	23
4.2.2. Preparo da solução de TBT .....	23
4.2.3. Desenhos experimentais .....	23
4.2.4. Determinação dos níveis de imposex.....	24
4.2.5. Análise estatística.....	25
<b>4.3. Determinar a toxicocinética do TBT acumulado pelos gastrópodes.....</b>	<b>25</b>

4.3.1. Animais .....	25
4.3.2. Preparação da solução de TBT radioativo .....	25
4.3.3. Desenho experimental.....	25
4.3.4. Contagem gama <i>in vivo</i> .....	26
4.3.5. Autorradiografia de corpo inteiro .....	26
4.3.6. Modelos cinéticos .....	26
4.3.7. Análise estatística.....	26
<b>4.4. Avaliar a influencia da matéria orgânica sobre a biodisponibilidade e bioacumulação do TBT em <i>S. brasiliensis</i>.....</b>	<b>27</b>
4.4.1. Animais .....	27
4.4.2. Coleta do efluente.....	27
4.4.3. Preparo das soluções .....	27
4.4.4. Desenho experimental.....	28
4.4.5. Análise de carbono orgânico .....	29
4.4.6. Análise dos butilestânicos .....	29
4.4.7. Análise estatística.....	30
<b>Capítulo V: Artigos Científicos.....</b>	<b>31</b>
5.1. “Biologia reprodutiva do gastrópode <i>Stramonita brasiliensis</i> (Gastropoda: Muricidae)” .....	33
5.2. “Season, size and original population: Elucidating effects on imposex”. .....	53
5.3. “Elucidating the toxicokinetics of TBT in a gastropod species by whole body autoradiography and <i>in vivo</i> gamma counting” .....	70
5.4. “Influência da matéria orgânica na acumulação do TBT por <i>Stramonita brasiliensis</i> ” .....	89
<b>Capítulo VI: Síntese da Discussão e Conclusões .....</b>	<b>104</b>
<b>Capítulo VII: Referências Bibliográficas .....</b>	<b>110</b>

# Lista de Figuras

- Figura 5.1-1 – *Stramonita brasiliensis*. Complexo glândula digestiva-gônada. Classificação macroscópica utilizada neste trabalho, baseada em Abidli *et al.* (2012): a) Imaturo, b) Meio maturo e c) Maturo. Seta azul: gônada, seta preta: glândula digestiva. .... 37
- Figura 5.1-2 – *Stramonita brasiliensis*. Variação mensal e frequência anual dos estágios de maturação gonadal a partir da análise histológica, para a) machos e b) fêmeas. .... 42
- Figura 5.1-3 – *Stramonita brasiliensis*. Correlação entre a avaliação macroscópica (eixo x dos graficos) e os resultados da análise histológica das gônadas (barras). a) fêmeas, b) machos. • significa correlação significativa entre a classificação visual e a histológica. .... 43
- Figura 5.1-4 – *Stramonita brasiliensis*. Variação mensal dos índices biofisiológicos: a) Índice de condição (CI), b) Índice gonadossomático (GSI) e c) Índice peniano (PI). A linha cinza bem como os dados em cinza indicam resultados para fêmeas, em preto, para machos. Linhas tracejadas indicam a média anual. As flechas indicam variação significativa entre amostragens consecutivas (Kruskal-Wallis seguido de análise de múltipla comparação,  $p < 0,05$ ). .... 44
- Figura 5.1-5 – Variação mensal da temperatura média superficial da água e do ar e das horas de luz diárias no Farol de Santa Marta (SC), Brasil. .... 46
- Figura 5.1-6 – *Stramonita brasiliensis*. Dosagem hormonal do complexo gonadal. a) Estradiol em fêmeas; b) Testosterona em fêmeas; c) Estradiol em machos e d) Testosterona em machos. Linhas cheias indicam hormônio total, linhas tracejadas indicam hormônio na forma livre. Barras indicam Erro Padrão. Letras mostram presença de diferença significativa (Kruskal-Wallis seguido de análise de múltipla comparação,  $p < 0,05$ ). .... 47
- Figura 5.2-1 – Location of sampling sites on the Brazilian coast. .... 57
- Figura 5.2-2 – Experimental design. .... 58
- Figura 5.2-3 – *Stramonita brasiliensis*. Imposex parameters obtained for *Stramonita brasiliensis* snails with different shell sizes exposed to tributyltin (TBT) by injections of  $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$  in experiments performed during

winter and summer. a) % imposex (gray bars, left axis) and vas deferens sequence index (VDSI; circles, right axis); b) Female penis length (FPL; mm, triangles). (A, B) denote statistically significant differences ( $p < 0.0001$ ) between sizes and/or seasons.....	60
Figura 5.2-4 – <i>Stramonita brasiliensis</i> . Results obtained for <i>Stramonita brasiliensis</i> snails of various sizes from Farol de Santa Marta (SC) exposed to tributyltin (TBT) by injections of $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ , in experiments performed during winter and summer. a) Condition index (CI) + E.P; b) Gonadosomatic index (GSI) + E.P. (A, B) denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments in each size. There was no control for the big snails in the winter experiment. ....	61
Figura 5.2-5 – <i>Stramonita brasiliensis</i> . Results for all female <i>Stramonita brasiliensis</i> snails from Farol de Santa Marta (SC) (classified by size) exposed to tributyltin (TBT) by injections of $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ . a) % imposex (gray bars, left axis) and vas deferens size index (VDSI; circles, right axis); b) female penis length (FPL; mm, triangles). (A, B, C) denote statistically significant differences between sizes (A–B $p < 0.05$ ; A/B–C $p < 0.01$ ). ....	62
Figura 5.2-6 – <i>Stramonita brasiliensis</i> . Results obtained for <i>Stramonita brasiliensis</i> snails from Torres (RS), Farol de Santa Marta (SC), and Aracruz (ES), with different sizes exposed to tributyltin (TBT) by injections of $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ , in experiments performed during summer. a) % imposex (gray bars, left axis) and vas deferens size index (VDSI; circles, right axis); b) female penis length (FPL; mm, triangles). There were no snails in the Torres (RS) and Aracruz (ES) experiments. (a, b) denote statistically significant differences ( $p < 0.0001$ ) between location of origin. ....	63
Figura 5.3-1 – Autoradiograms of thin-layer chromatograms.....	76
Figura 5.3-2 – <i>Buccinum undatum</i> . a) $^{113}\text{Sn}$ -TBT concentration in tissues by time during 6 hours of exposure; b) $^{113}\text{Sn}$ -TBT depuration in tissues by time during 53 days of elimination. ....	80
Figura 5.3-3 – <i>Buccinum undatum</i> . Long term average bioaccumulation of $^{113}\text{Sn}$ -TBT.....	81
Figura 5.3-4 – <i>Buccinum undatum</i> . Optical images and autoradiograms of tissue sections from <i>B. undatum</i> exposed to $^{113}\text{Sn}$ -TBT along experiment time. a) at end of experiment, b) in 1 week of elimination, c) in 4 weeks of	

elimination and d) in 8 weeks of elimination. Scale bars represent relative radioactivity in digital light units (DLU mm<sup>-2</sup>). Abbreviations: CA-contact area; DG-digestive gland; DT-digestive tract; C-ctenidium; GN-gonad; H-heart; HG-hypobranchial gland; I-intestine; K-kidney; O-osphradium; ST-stomach; ECG-egg capsule gland; P-penis; SV-seminal vesicle..... 82

Figura 5.3-5 – *Buccinum undatum*. Radioactivity levels (DLU mm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) measured in tissues of *B. undatum* exposed 6 h to <sup>113</sup>Sn-TBT and following 1, 4 and 8 weeks of depuration). Each bar represents the mean value measured in 2-8 different sections of from one individual. No bar to indicate no radioactivity detected. Lowercase letters (a, b, c...) indicate significant differences between tissues during in each time of experiment. \* Asterisks indicate significant differences between females and males in each time of experiment (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01). Arrows to indicate if radioactivity levels improve or decrease in each tissues over time of experiment. See Figura 5.3-4 for the abbreviations used..... 83

Figura 5.4-1 – Concentrações de carbono orgânico total e dissolvido nos diferentes tratamentos, ao início e final do experimento \* diferença entre tratamentos e o controle no início e ao final do experimento (\*\* p <0,01, \*\*\* p < 0,001); # diferença entre o início e o final de experimento no respectivo tratamento. .... 98

Figura 5.4-2 – *Stramonita brasiliensis*. a) Concentrações de butilestânicos na água ao final do experimento. \* diferença significativa em relação ao outro tratamento. b) Concentração de butilestânicos no tecido dos organismos ao final do experimento..... 100

Figura 5.4-3 – Representação esquemática da influência da presença da matéria orgânica dissolvida no aumento do BCF durante o início da fase de absorção. Adaptada de Haitzer *et al.* 2001..... 102

## Lista de Tabelas

Tabela 5.1-1 – <i>Stramonita brasiliensis</i> . Desenvolvimento gonadal e características de cada estágio de maturidade.....	38
Tabela 5.2-1 – Previous laboratory studies investigating the development of imposex.....	64
Tabela 5.3-1 – <i>Buccinum undatum</i> . Measurement efficiency (e, in %, mean $\pm$ SD, n = 28) for X-rays (24-27 keV) and g-ray (392 keV) in whelk standards. The ratio of X-rays and g-ray counts measured is also shown. ....	77
Tabela 5.4-1 – Parâmetros físico-químicos do efluente doméstico bruto, coletado na Estação de Tratamento de Rio Grande.....	96
Tabela 5.4-2 – Teores de carbono orgânico (média e desvio padrão em mg L <sup>-1</sup> ) das amostras de efluente doméstico bruto e ácido húmico (A.H.) comercial. ....	97
Tabela 5.4-3 – <i>Stramonita brasiliensis</i> . Índice de Degradação de Butilestânicos (BDI) e Fator de Bioconcentração (BCF), em tecido de gastrópodes expostos a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TBT durante 1 semana. ....	99

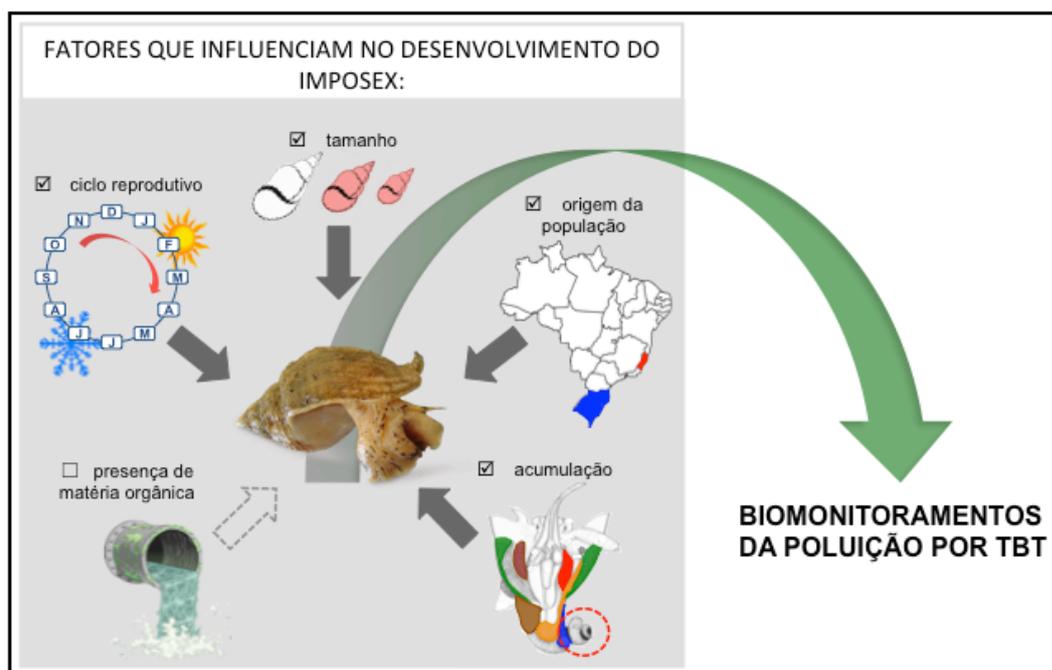
# Resumo

O tributilestanho (TBT) foi usado como anti-incrustante em tintas que revestiam embarcações e estruturas submersas. Apesar do uso ter sido banido devido a toxicidade sobre organismos não alvo, as propriedades químicas do TBT fazem com que altos níveis ainda sejam encontrados em sedimentos de regiões portuárias do mundo todo. O imposex é utilizado como biomarcador de baixo custo para mapear áreas poluídas pelo composto. Neste trabalho buscou-se avaliar a influência de fatores ambientais e biológicos, intrínsecos ao ciclo reprodutivo e a fisiologia da espécie bioindicadora, sobre o desenvolvimento do imposex. Os parâmetros reprodutivos avaliados durante um ano indicaram ciclo anual, com retração do tamanho do pênis dos machos durante o inverno, o que pode causar variações nos índices de imposex. A partir de experimentos de indução de imposex, foi avaliada em resposta das fêmeas oriundas de populações diferentes, coletadas em diferentes épocas do ano e de diferentes faixas de tamanho, quando expostas ao TBT. Os resultados indicaram que as fêmeas de até 40 mm de comprimento da concha e expostas durante seu período reprodutivo desenvolvem imposex com maior intensidade. Além disso, as fêmeas oriundas da população do Sudeste brasileiro (ES) foram significativamente mais sensíveis que as do Sul do país (SC e RS). Sabe-se que no ambiente aquático, uma porção do TBT é absorvida e acumulada por organismos. Através dos métodos da contagem gama *in vivo* e da autorradiografia, foi avaliada a distribuição do TBT e sua toxico-cinética em *Buccinum undatum* exposto via água. O TBT foi absorvido rapidamente do meio aquático, sendo acumulado e depurado de forma semelhante por machos e fêmeas. Imediatamente após a exposição, o TBT se concentra principalmente nos órgãos respiratórios e sensoriais, de onde grande parte é eliminado em cerca de 3 dias ou transfere-se para rim e intestino. Após oito semanas de depuração, os órgãos que ainda apresentam significativos níveis de TBT são osfrádio, glândula hipobranquial, intestino, rim e coração, em machos, vesícula seminal e em fêmeas, glândula da capsula do ovo. Esses resultados nos permitem indicar que as análises de butilestânicos sejam

realizadas em todo o tecido mole dos organismos e não somente no complexo gônada/glândula digestiva para evitar subestimação dos resultados. Por fim, foi investigado se a presença da matéria orgânica influencia na acumulação do TBT por *S. brasiliensis* e os resultados, apesar de inconclusivos, não mostraram influência significativa da presença da matéria orgânica na acumulação dos butilestânicos pela espécie. Avaliando os resultados obtidos, fica claro que é verdadeira a hipótese levantada no início do trabalho, de que existem fatores biológicos e ambientais que influenciam significativamente na indução do imposex e que podem causar erros de interpretação dos resultados, devendo ser considerados nos biomonitoramentos da poluição por TBT nas zonas costeiras.

**Palavras-chave:** autorradiografia, bioacumulação, biologia reprodutiva, biomonitoramento, *Buccinum undatum*, ciclo reprodutivo, imposex, *Stramonita brasiliensis*, sensibilidade, tributilestanho.

## Resumo gráfico



# Abstract

Tributyltin (TBT) was used as antifouling in paints that coated vessels and submerged structures. Although the use has been banned due to toxicity to non-target organisms, high levels to still be found in sediments of harbor regions around the world. The imposex is used as a low cost biomarker to map TBT polluted areas. This work aimed to evaluate the influence of environmental and biological factors, intrinsic to the reproductive cycle and the physiology of the bioindicator species, on the development of imposex. The reproductive parameters of *Stramonita brasiliensis* were evaluated during one year indicated annual cycle, with retraction of the penis size of the males during the winter, which can cause variations in the indices of imposex. After imposex induction in controlled conditions of laboratory, was evaluated the response in females from different populations, collected at different times of the year and of different size bands. The results indicated that females up to 40 mm in shell length and exposed during their reproductive period, develop imposex with greater intensity. In addition, females from the Brazilian Southeastern (ES) population were significantly more sensitive than those from the South of the country (SC and RS). It is known that in the aquatic environment, a portion of TBT is absorbed and accumulated by organisms. Were evaluated through *in vivo* gamma counting and whole body autoradiography methods, the distribution of TBT and its toxicokinetics in *Buccinum undatum* exposed via water. TBT was rapidly absorbed from the aquatic environment, being accumulated and similarly cleared by males and females. Immediately after exposure, TBT is mainly concentrated in the respiratory and sensory organs, where much of it is eliminated in about 3 days or transferred in part to the kidney and intestine. After eight weeks of clearance, organs that still have significant levels of TBT are the osphradium, hypobranchial gland, intestine, kidney and heart and in males, seminal vesicle. Females of did not accumulated TBT in their reproductive organs and it is worth mentioning that all soft tissue of *B. undatum* should carried out throughout the soft tissue of the organisms and not only in the complex gonad/digestive gland to avoid underestimation of the results.

Finally, it was investigated whether the presence of organic matter influences the accumulation of TBT by *S. brasiliensis* and the results, although unconcluded, showed no influence of the presence of organic matter in the accumulation of butyltins by the species. Evaluating the results obtained in this thesis, it is clear that the hypothesis raised at the beginning of the study is true, there are biological and environmental factors that significantly influence the induction of the imposex and that can cause errors of interpretation of the results and should be considered in biomonitoring of the TBT in coastal areas.

**Keywords:** autoradiography, bioaccumulation, biomonitoring, *Buccinum undatum*, imposex, reproductive biology, reproductive cycle, sensibility, *Stramonita brasiliensis*, tributyltin.

## Capítulo I: Introdução

O desenvolvimento industrial e tecnológico ocorrido no último século levou ao aumento da utilização do transporte marítimo.

Essa maior demanda tornou necessário o desenvolvimento de compostos anti-incrustantes eficientes, que prevenissem o assentamento e o crescimento de organismos marinhos nos cascos das embarcações. Historicamente, diversos compostos químicos perigosos para a saúde humana foram utilizados como biocidas, sendo retirados do mercado pela própria indústria durante a década de 1960. Em meados de 1970, acreditou-se ter chegado à fórmula anti-incrustante ideal, o tributilestanho (TBT). Entretanto, poucos anos depois, foi descoberta sua toxicidade generalizada para os organismos, o que levou o TBT a ser referenciado como “o produto químico mais tóxico já deliberadamente introduzido ao ambiente marinho” (Evans *et al.*, 1995).

Diante das implicações negativas dos efeitos do TBT, a Organização Marítima Internacional (IMO) determinou o banimento global da presença do TBT em tintas que revestiam os cascos das embarcações para 1º de janeiro de 2008. No entanto, na América Latina, somente Brasil e Argentina possuem legislações que contemplam os compostos organoestânicos. Para o Brasil, podem ser destacadas as resoluções CONAMA 357/2005 e 454/2012 que

estabelecem respectivamente concentrações máximas de TBT no ambiente aquático e sedimentos dragados e a Norma 23-DPC/2007, que estabelece a inspeção e a necessidade de registro de todos os sistemas anti-incrustantes e também proíbe o uso de tintas a base de TBT, bem como o manejo dos seus resíduos. Apesar dos relatos de recuperação em populações anteriormente afetadas por imposex após a regulação restritiva do uso de TBT nas tintas (Morton, 2009), muitos estudos recentes descrevem níveis extremamente altos de tributilestano em sedimentos costeiros do mundo todo (Mattos et al., 2017; Okoro et al., 2011), inclusive no Brasil (Artifon et al., 2016).

O mais bem estudado efeito da exposição de organismos ao TBT é o imposex. Este fenômeno consiste no surgimento de órgãos sexuais secundários masculinos (pênis e vaso deferente) em fêmeas de moluscos prosobrânquios (Smith, 1971), podendo acarretar a esterilização das fêmeas e causar o declínio das populações das espécies afetadas. O imposex já foi observado em mais de 260 espécies de gastrópodes em todo mundo (Titley-O'Neal et al., 2011) e vem sendo utilizado como biomarcador de baixo custo para mapear áreas poluídas por butilestânicos. Nos biomonitoramentos realizados na costa brasileira, o gastrópode *Stramonita haemastoma* (*Stramonita brasiliensis*, desde Claremont et al. (2011) tem sido o mais utilizado, devido a sua ampla distribuição, grande abundância e fácil coleta. A espécie ocorre em latitudes tropicais e temperadas quentes dos oceanos Atlântico e Pacífico leste, habitando a costa do Brasil e Uruguai (Rios, 1985).

Ao longo dos anos, diversas hipóteses foram propostas para explicar o mecanismo bioquímico de indução do imposex. Uma delas postula que após ser bioacumulado, o TBT poderia interferir no metabolismo dos hormônios andrógenos, inibindo a atividade da aromatase P450 e impedindo a conversão natural de andrógenos (testosterona) em estrógenos (estradiol) (Santos et al., 2002) ou, alternativamente, inibindo a excreção da testosterona (Ronis & Mason, 1996). Mais recentemente, Gooding et al. (2003) propuseram que a interferência do TBT se daria na inibição da esterificação da testosterona, levando ao aumento da testosterona na forma livre, que por sua vez induziria o imposex. Atualmente, a via mais aceita é a do ácido retinóide (RXR) (Horiguchi et al., 2012). Embora diversas evidências tenham surgido a partir de alterações hormonais na indução do imposex, a falta de dados biológicos sobre os

mecanismos básicos que controlam a reprodução nestes organismos dificulta a determinação exata do mecanismo subjacente ao fenômeno.

Além das dúvidas relacionadas ao mecanismo de indução e desenvolvimento do imposex, cabe salientar a importância do conhecimento da sensibilidade dos organismos utilizados como bioindicadores da poluição por TBT. A sensibilidade já relatada, varia de ausência de efeito em *Theodoxus fluviatilis* (Neritidae), *Bithynia tentaculata* (Bithyniidae), *Hydrobia ventrosa* and *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae), *Columbella rustica* (Columbellidae), *Capulus ungaricus* (Capulidae), and *Turritella communis* (Turritellidae) até o declínio da população de *Nucella lapilus* no Reino Unido (Bryan *et al.*, 1988; Gibbs & Bryan, 1996).

Estudos independentes realizados com *S. brasiliensis* mostram indícios de sensibilidade diferenciada entre populações dessa espécie. Por exemplo, estudos de Limaverde *et al.* (2007) com organismos coletados no Rio de Janeiro mostraram indução de imposex com doses de estanho (Sn) na ordem de  $\text{ng g}^{-1}$ , enquanto que Rossato (2011) observou os mesmos estágios de desenvolvimento de imposex, porém quando os organismos foram injetados com Sn em doses na ordem de  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Essa diferença de sensibilidade entre populações de uma mesma espécie poderia ser atribuída a idade ou estágio de maturação em que os indivíduos se encontram (Burger *et al.*, 2007), ou mesmo as variações nos fatores ambientais do local onde habitam (Sternberg *et al.*, 2010), entretanto os reais motivos responsáveis pela sensibilidade diferenciada ainda necessitam mais melhor estudados.

Os principais terminais portuários do Brasil já foram monitorados quanto à poluição por organoestânicos utilizando-se o imposex como biomarcador (Artifon *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2012b; Costa *et al.*, 2008) e também a análise de butilestânicos acumulados nos tecidos. Em praticamente todos os locais, as concentrações nos tecidos e os índices de imposex observados foram maiores quanto mais próximos aos terminais portuários e regiões de marinas e terminais pesqueiros.

Os organismos marinhos são capazes de acumular contaminantes diretamente do meio líquido. Para o TBT, esta via já foi demonstrada em moluscos bivalves (Coelho *et al.*, 2002a) e a difusão passiva seria o mecanismo de transporte entre o meio líquido e o interior dos organismos. Para

*S. brasiliensis*, embora um número considerável de estudos ecológicos tenha sido realizado no Brasil, poucos trabalhos visando a indução de indução de imposex foram realizados em laboratório, sob condições controladas de exposição (Limaverde *et al.*, 2007; Rossato, 2011). *S. brasiliensis* é uma espécie carnívora, que vive aderida em superfícies duras, sendo a água circundante e o alimento as principais vias de exposição ambiental ao TBT (Rossato *et al.*, 2014). Apesar da importância desses gastrópodes para os biomonitoramentos da poluição por TBT, são escassas as informações sobre como se dá acumulação, distribuição e eliminação do TBT pelos organismos. A maior parte destes trabalhos utiliza o método da dissecação dos órgãos e tecidos para a quantificação do TBT e seus metabólitos (Harding *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2010). Assim também os estudos de biomonitoramento no mundo todo, utilizando variadas espécies, em que é comum a quantificação dos butilestânicos no complexo gônada/glândula digestiva (Abidli *et al.*, 2012; Cacciatore *et al.*, 2016a; Stroben *et al.*, 1992). Essa pré-seleção dos órgãos avaliados acaba por limitar o conhecimento sobre a distribuição do contaminante nos organismos, bem como poderia causar sub ou superestimação da contaminação presente no ambiente avaliado, uma vez que existem indicativos que as espécies metabolizam e eliminam o composto de maneira distinta.

Em termos de comportamento ambiental, uma vez liberado no ambiente marinho, os organoestânicos são rapidamente absorvidos por organismos ou adsorvidos à partículas em suspensão e à matéria orgânica particulada. Nos sedimentos oxidados, a degradação ocorre em poucas semanas (Clark *et al.*, 1988), enquanto que em regiões frias e anóxicas é extremamente lenta, variando de 2 anos até décadas (Dowson *et al.*, 1996). Uma questão importante diz respeito às interações do TBT com parâmetros ambientais, que podem modificar sua reatividade e sua biodisponibilidade, alterando, portanto, sua toxicidade sobre organismos aquáticos. É amplamente reconhecido que as regiões mais contaminadas por TBT são as áreas portuárias ou próximas a marinas e estaleiros. Por se localizarem próximos a áreas urbanas, essas regiões sofrem também grande influência do aporte de esgoto doméstico e este esgoto, por sua vez, é rico em matéria orgânica. Trabalhos como o de Bangkokphol *et al.* (2009) indicaram alterações na biodisponibilidade do TBT

relacionadas a presença de matéria orgânica. Sendo o imposex um efeito da bioacumulação do TBT pelos gastrópodes, é de extrema importância para os estudos ambientais, que a influência da matéria orgânica sobre a acumulação dos butilestânicos pelos organismos seja estabelecida.

Já se passaram cerca de 40 anos desde que o imposex foi descrito pela primeira vez (Smith, 1971), e embora o uso de tintas a base de TBT tenha sido banido, a sua persistência ambiental e o uso irregular que ainda permanece em muitas regiões faz com que o composto seja considerado um problema de longo prazo e uma ameaça aos ecossistemas marinhos e estuarinos do mundo todo (Furdek et al., 2016). Dada a importância da utilização do imposex como biomarcador de baixo custo da poluição por TBT, é essencial que sejam conhecidas as variáveis que influenciam a acumulação do composto e que podem alterar a sensibilidade dos organismos expostos. Somente assim os dados de biomonitoramento ao longo de grandes extensões de costa poderão ser melhor interpretados e até mesmo comparações entre estudos com espécies diferentes poderão ser realizados, sem que os vieses implícitos aos organismos utilizados, acarretem desvios na interpretação dos dados.

## Capítulo II: Hipótese

**O**s resultados das avaliações ambientais da contaminação por TBT baseadas na ocorrência de imposex e na biocumulação desse composto por moluscos gastropodes são influenciadas por fatores ambientais e biológicos, intrínsecos ao ciclo de vida da espécie bioindicadora ou relacionados ao seu habitat.

## Capítulo III: Objetivos

### Geral:

Esta tese tem como principal objetivo esclarecer lacunas no que diz respeito a utilização do imposex como biomarcador da poluição por tributilestanho.

### Específicos:

- Elucidar o ciclo reprodutivo do gastrópode *Stramonita brasiliensis*;
- Verificar se a sensibilidade de *Stramonita brasiliensis* ao TBT varia de acordo com o período do ciclo reprodutivo, o tamanho dos organismos e se há diferença de sensibilidade entre organismos de diferentes populações do sudeste e sul do Brasil
- Determinar a toxicocinética do TBT acumulado pelo gastrópode *Buccinum undatum*;
- Avaliar a influencia da matéria orgânica sobre a biodisponibilidade e biocumulação do TBT em *S. brasiliensis*.

## Capítulo IV: Material e Métodos

A descrição do Material e Métodos será apresentada de acordo com o objetivo a ser cumprido e segue a ordem em que se apresenta na tese.

### 4.1. Elucidar o ciclo reprodutivo do gastrópode *Stramonita brasiliensis*

#### 4.1.1. Coletas mensais

O estudo foi realizado a partir da coleta mensal (de março de 2012 a fevereiro de 2013) de pelo menos 40 organismos, no costão rochoso da Praia Grande, Farol de Santa Marta (SC), Brasil. Os organismos foram transportados até o laboratório em caixas plásticas contendo água do mar e em laboratório, os organismos foram anestesiados em solução de Cloreto de Magnésio (7%), medidos e pesados e removidos da concha com o uso de um torno pequeno.

#### 4.1.2. Análise macroscópica

O complexo glândula digestiva-gônada foi avaliado macroscopicamente ainda em campo, seguindo a classificação de Abidli *et al.* (2012):

- **Imaturo:** quando a gônada não é distinguível da glândula digestiva;
- **Meio Maduro:** quando a gônada é distinguível da glândula digestiva pelo seu tamanho e cor, entretanto ainda é proporcionalmente menor que a glândula digestiva;

- **Maturo:** quando a gônada está desenvolvida e proporcionalmente maior que a glândula digestiva.

Após a avaliação macroscópica, o complexo glândula digestiva-gônada de cada organismo foi pesado separadamente e armazenado para posterior avaliação histológica ou hormonal.

#### **4.1.3. Análises histológicas**

Foram analisados histologicamente, no mínimo 15 fêmeas e 15 machos por mês. As análises foram feitas mensalmente no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Foi realizado um corte transversal da gônada e retirada uma fração de 1 mm que foi posteriormente processada através de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em Paraplast Xtra®. Após a inclusão, foi feita a microtomia de cada região e as lâminas foram coradas com solução hematoxilina-eosina. As lâminas secas foram observadas em microscópio óptico Olympus com a magnificação de 400x e fotomicrografadas. A identificação dos estados de desenvolvimento da gametogênese nos cortes histológicos das gônadas de ambos os sexos foi baseada na escala de maturação apresentadas no trabalho de Vasconcelos *et al.* (2008), adaptada para a espécie em questão.

#### **4.1.4. Determinação dos níveis de hormônios esteroides**

8 machos e 8 fêmeas de cada amostragem mensal tiveram seus níveis hormonais quantificados. As amostras de tecido do complexo gônada-glândula digestiva foram pré-processadas a fim de se realizar a extração dos hormônios esteroides de interesse. Após extração, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio e posteriormente as amostras destinadas a determinação de hormônios totais e livres hormônio total e livre foram ressuspensas com solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,6). A quantificação da testosterona e do 17 $\beta$ -estradiol foi realizada de acordo com o protocolo provido pelo kit de radioimunoensaio (RIA) (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA). Os níveis hormonais foram relatados de acordo com o peso de tecido de cada amostra.

#### 4.1.5. Parâmetros biofisiológicos

O Índice de Condição (IC) dos organismos foi avaliado mensalmente através do cálculo:

$$IC = \left[ \frac{\text{peso mole total (g)}}{\text{peso total (g)}} \right] * 100$$

A evolução mensal do ciclo reprodutivo em ambos os sexos foi avaliada utilizando o Índice Gonadossomático (IGS), calculado para cada indivíduo da seguinte forma:

$$IGS = \left[ \frac{\text{peso do complexo gonada - glandula digestiva (g)}}{\text{peso mole (g)}} \right] * 100$$

Em machos, o Índice Peniano (IP) foi aplicado a fim de caracterizar o período de cópula, bem como eliminar o tamanho-dependência do comprimento do pênis com relação ao tamanho do organismo:

$$IP = \left[ \frac{\text{tamanho do penis (mm)}}{\text{tamanho total (mm)}} \right] * 100$$

#### 4.1.6. Análise estatística

A razão sexual das amostras, expressa pela percentagem de indivíduos de cada sexo e como taxa de machos por fêmeas (M:F), foi comparada com paridade (1:1) usando o teste Qui-Quadrado (Teste- $\chi^2$ ). A avaliação macroscópica das gônadas, realizada de forma visual também foi comparada aos resultados obtidos através da análise histológica, utilizando o Qui-Quadrado. Os dados biométricos e hormonais foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e como não obedeceram aos pressupostos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de análise de múltipla comparação para verificar se haviam e onde ocorriam diferenças significativas entre os meses de coleta. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software livre R, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

## **4.2. Verificar se a sensibilidade de *Stramonita brasiliensis* ao TBT varia de acordo com o período do ciclo reprodutivo, o tamanho dos organismos e se há diferença de sensibilidade entre organismos de diferentes populações do sudeste e sul do Brasil**

### **4.2.1. Locais de coleta**

Para a realização deste trabalho e de acordo com o objetivo a ser alcançado, foram realizadas coletas de *Stramonita brasiliensis* em 3 áreas distintas ao longo da costa brasileira. Em Torres (RS) (29°20'40,6" – 49°43'34,4"), no Farol de Santa Marta (SC) (28°35'35,8" – 48°48'59,0") e em Aracruz (ES) (19°52'27,5" – 40°04'55,6"). Os organismos de Torres e Farol de Santa Marta foram transportados até o laboratório CONECO (FURG) em caixas plásticas contendo água do mar proveniente do local de coleta. Os organismos de Aracruz foram transportados para o Laboratório de Malacologia da UFES. Os organismos permaneceram uma semana em aclimatação nas mesmas condições do experimento (temperatura 20°C e fotoperíodo 12C:12E). Em campo também foram coletados mexilhões, os quais foram congelados e oferecidos semanalmente aos gastrópodes como alimento.

### **4.2.2. Preparo da solução de TBT**

Foi preparada uma solução de TBT na concentração de 4,8 µg µL<sup>-1</sup> em etanol. Esta solução foi utilizada em todos os experimentos deste capítulo.

### **4.2.3. Desenhos experimentais**

A fim de avaliar a sensibilidade dos organismos, foram realizados 4 experimentos seguindo exatamente a mesma metodologia, onde os organismos foram anestesiados e injetados no pé com 0,5 µg TBT g<sup>-1</sup> (as injeções foram todas realizadas pela mesma pessoa, para garantir a precisão da dose). Os volumes das injeções foram calculados como peso do organismo x dose a ser injetada / concentração da solução.

- **Experimento 1 e Experimento 2:** realizados no verão e no inverno, respectivamente, ambos com organismos provenientes do Farol de Santa Marta (SC).
- **Experimento 3:** realizado no verão, com organismos provenientes de Torres (RS).
- **Experimento 4:** realizado no verão, com organismos provenientes de Aracruz (ES).

Após as injeções os organismos foram mantidos durante 30 dias em água marinha filtrada, alimentados com mexilhão congelado e tendo o meio totalmente renovado 2 vezes por semana.

#### 4.2.4. Determinação dos níveis de imposex

Ao final do período de exposição, os animais foram anestesiados, medidos e classificados de acordo com o tamanho da concha em: < 30 mm (pequenos), entre 30 e 40 mm (médios) e > 40 mm (grandes). A concha foi extraída usando um torno de bancada, as partes moles e as gônadas foram observadas e a presença de imposex analisada.

Posteriormente foi calculada a incidência de imposex (%I):

$$\%I = \frac{\% \text{ de fêmeas imposexadas}}{\text{total de fêmeas da amostra}}$$

O comprimento médio do pênis feminino (FPL) :

$$FPL = \frac{\text{soma do comprimento dos penis das fêmeas imposexadas}}{\text{total de fêmeas imposexadas da amostra}}$$

E o Índice de Desenvolvimento do Vaso Deferente (VDSI), de acordo com Stroben *et al.*, (1992), e parcialmente modificado para *S. brasiliensis* por Toste *et al.*, (2013):

$$VDSI = \frac{\text{soma do VDS das fêmeas imposexadas}}{\text{total de fêmeas da amostra}}$$

#### **4.2.5. Análise estatística**

Os dados foram testados quanto as premissas de normalidade e homocedasticidade. As diferenças foram determinados através de ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas no RStudio. Os efeitos foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### **4.3. Determinar a toxicocinética do TBT acumulado pelos gastrópodes.**

#### **4.3.1. Animais**

Para o estudo com *Buccinum undatum*, realizado na Université du Québec a Rimouski, Canadá, os organismos foram coletados por pescadores no estuário Saint Laurent, nas proximidades da cidade de Rimouski – Québec e mantidos em laboratório para aclimação durante uma semana nas mesmas condições do experimento (temperatura da água  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinidade  $24 \pm 2$  e fotoperíodo 12C:12E). Os organismos foram alimentados três vezes por semana com peixe congelado obtido no mesmo estuário.

#### **4.3.2. Preparação da solução de TBT radioativo**

O cloreto de TBT foi sintetizado de acordo com Rouleau (1998). Brevemente,  $^{113}\text{Sn(IV)}$  inorgânico foi extraído em éter dietílico e reagido com  $\text{ButMgCl}$  para resultar em  $\text{But}_3^{113}\text{Sn}$ .

#### **4.3.3. Desenho experimental**

O experimento foi dividido em 2 partes: o período de exposição e o de depuração ao contaminante.

Os organismos foram numerados e colocados em aquários contendo 30 litros de água salgada (salinidade 24) previamente filtrada ( $0.45 \mu\text{m}$ ). A concentração nominal de exposição foi  $110 \text{ ng L}^{-1}$  ( $10 \text{ KBq } \mu\text{g}^{-1}$ ) de TBT. O período de exposição foi de 6 horas, com os organismos submetidos a contagem gama *in vivo* a cada 1,5 horas. Após a exposição, os gastrópodes foram transferidos para tanques de 300 litros, com renovação constante de

água marinha. O período de depuração foi de 53 dias e a contagem gama *in vivo* foi realizada 2 vezes por dia nos 3 primeiros dias e 1 vez por dia até o final dos 53 dias. Para a autorradiografia foram retirados 2 indivíduos (1 macho e 1 fêmea) em diferentes etapas da experimentação: ao final do período de exposição e após 1, 4 e 8 semanas de depuração.

#### **4.3.4. Contagem gama *in vivo***

Cada indivíduo exposto foi periodicamente removido do aquário, colocado em uma placa plástica e precisamente posicionado sob o cilíndrico NaI (TI) do detector gama. A atividade do isótopo  $^{113}\text{Sn}$ -TBT foi medida durante 1 ou 2 minutos. A quantidade de radiação gama medida foi convertida em contagens por minutos (CPM) e corrigida pelo background e pelo decaimento.

#### **4.3.5. Autorradiografia de corpo inteiro**

A autorradiografia (WBARG, do inglês *Whole Body Autoradiography*) foi realizada de acordo com a técnica desenvolvida por Ullberg *et al.* (1982). Os indivíduos foram anestesiados com  $\text{MgCl}_2$ , retirados da concha e emblocados em gel 5% de carboximetilcelulose e congelados sob nitrogênio líquido. Os blocos foram seccionados em cortes de 50  $\mu\text{m}$  a  $-20^\circ\text{C}$ , em crio micrótomo Leica CM3600. Os cortes foram expostos em uma tela de fósforo durante 1 semana. As telas foram então digitalizadas em *Cyclone Phosphor Imager* e a distribuição da radioatividade nos tecidos foi visualizada e quantificada utilizando o software *Optiquant*.

#### **4.3.6. Modelos cinéticos**

As constantes de assimilação e de eliminação do gastrópode *B. undatum* para o TBT foram calculadas a partir dos dados de radiação gama *in vivo*, obedecendo o método de Børretzen & Salbu (2009). A partir destas constantes calculou-se o Fator de Bioconcentração (BCF).

#### **4.3.7. Análise estatística**

Para os resultados autorradiográficos, tecidos e órgãos foram comparados entre si e entre os tempos de exposição através da análise de ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Machos e fêmeas foram

comparadas por teste-t. Quando os pressupostos de normalidade e homocedasticidade não foram alcançados, os dados foram transformados por logaritimização ou foi realizada análise não paramétrica de Kruskal-Walis. As análises foram realizadas no RStudio.

#### **4.4. Avaliar a influencia da matéria orgânica sobre a biodisponibilidade e bioacumulação do TBT em *S. brasiliensis*.**

##### **4.4.1. Animais**

Um total de 210 organismos da espécie *Stramonita brasiliensis* foram coletados na Praia do Cal, Torres (RS) e transportados até o laboratório CONECO em caixas plásticas contendo água do mar. Os organismos permaneceram uma semana em aclimatação nas mesmas condições do experimento (temperatura 20°C e fotoperíodo 12C:12E). Em campo também foram coletados mexilhões que foram congelados e oferecidos semanalmente aos gastrópodes como alimento.

##### **4.4.2. Coleta do efluente**

O efluente doméstico bruto foi coletado na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), localizada na cidade do Rio Grande. A amostra coletada foi armazenada em frascos de vidro âmbar envolvidos com papel alumínio e armazenada a 4°C guardada em geladeira até o experimento.

Propriedades físico-químicas do afluente quando coletado:

**Oxigênio dissolvido:** 1,20 mg L<sup>-1</sup> a 22°C

**pH:** 7,3

**Salinidade:** 0

##### **4.4.3. Preparo das soluções**

###### **Solução de ácido húmico comercial**

O ácido húmico comercial (CAS: 415-93-6) foi adquirido pela Sigma-Aldrich e o preparo da solução foi baseado no trabalho de Janknecht *et al.* (2009). Previamente foi feita uma solução de NaOH em água ultrapura. A esta

solução previamente preparada foi adicionado o ácido húmico comercial (em concentração equivalente a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono orgânico total). A solução foi armazenada em frasco âmbar na geladeira.

### **Solução de TBT**

Primeiro foi preparada uma solução estoque de TBT em acetona, na concentração de  $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, foi preparada a solução trabalho, diluindo  $600 \text{ } \mu\text{L}$  da solução estoque em  $10 \text{ mL}$  de acetona, obtendo uma solução de  $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **4.4.4. Desenho experimental**

O experimento foi realizado com água ultrapura salinizada artificialmente, a fim de garantir menores níveis de matéria orgânica iniciais. Os tratamentos foram preparados da seguinte forma:

- **Controle:** água ultrapura salinizada artificialmente com sal artificial (Coralife) (salinidade 30) – é a água utilizada em todo experimento. No restante do trabalho será chamada de “água marinha artificial”.
- **TBT ( $1,5 \text{ } \mu\text{g TBT L}^{-1}$ ):** foram adicionados  $125 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de trabalho de TBT em  $5 \text{ L}$  de água marinha artificial.
- **TBT + Efluente (10% v/v):** foi adicionado 10% do volume do aquário em efluente bruto e a este foi adicionado o TBT como no tratamento acima a fim de atingir a concentração de  $1,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .
- **TBT + Ácido Húmico:** previamente ao experimento foi calculado a partir da análise de carbono orgânico do efluente e da solução mãe de ácido húmico, o volume da solução mãe de ácido húmico a ser adicionado para que a concentração de carbono total neste tratamento se assemelhasse ao tratamento TBT + Efluente. Após a preparação do meio, foi adicionado TBT como nos tratamentos acima. Após a preparação dos tratamentos, foi retirada uma alíquota de água de cada aquário para análise de Carbono orgânico, como será descrito abaixo.

O experimento teve duração de uma semana e os aquários foram cobertos com papel alumínio para reduzir a fotodegradação do TBT.

Ao final da semana de exposição, foram retiradas duas alíquotas de água de cada aquário e destinadas a análise de Carbono orgânico e

Butilestânicos em água. Os organismos foram anestesiados e sacrificados e o tecido mole destinado a análise da bioacumulação de Butilestânicos.

#### **4.4.5. Análise de carbono orgânico**

As análises foram realizadas a partir do método de combustão em alta temperatura, no equipamento Shimadzu TC 5000 do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FURG. Para cada tratamento descrito anteriormente e também em amostras do efluente bruto e da solução de ácido humico, foi realizada a análise de carbono orgânico seguindo a metodologia:

##### **Carbono Orgânico Total (COT):**

Uma alíquota de 50 mL de cada tratamento foi acidificada com HCl 1% até pH ~ 2. Em seguida, foram transferidos 15 mL para um frasco âmbar previamente calcinado e identificado. O procedimento foi feito em triplicata.

##### **Carbono Orgânico Dissolvido (COD):**

Uma alíquota de 50 mL de água proveniente de cada tratamento foi filtrada, utilizando filtros de fibra de vidro 0,7 µm, previamente calcinados a 450°C durante 6h. Posteriormente as amostras foram acidificadas com HCl 1% até pH ~ 2. Em seguida, 15 mL de cada amostra foram transferidos para frasco âmbar previamente calcinado e identificado. O procedimento foi realizado em triplicata.

#### **4.4.6. Análise dos butilestânicos**

Para avaliar as concentrações de TBT efetivamente assimilado e a capacidade de metabolização ao longo do tempo, foram avaliados os tecidos dos organismos expostos. As amostras passaram por um pré tratamento onde os compostos butilestânicos foram extraídos por sonificação com uma solução de tropolona em metanol, em seguida foi realizada extração líquido-líquido com diclorometano com troca de solvente para hexano e derivatização com brometo de pentilmagnésio em éter dietílico. Os compostos pentilados foram extraídos com hexano. Os extratos orgânicos foram purificados em coluna de sílica-gel condicionada com hexano-tolueno (1:1) e injetados em cromatógrafo a gás Perkin Elmer Clarus 500 MS equipado com uma coluna Elite-5MS, acoplado a

um espectrômetro de massas de baixa resolução (Castro et al., 2015). O controle de qualidade foi realizado através de análises de brancos entre as amostras, bem como pelo uso de padrão interno (tetrabutilestanho) e de recuperação (tripropilestanho).

#### **4.4.7. Análise estatística**

Os dados foram testados quanto as premissas de normalidade e homocedasticidade. Diferenças entre tratamentos foram determinados por ANOVA uma via ou de duas vias. As análises foram realizadas no RStudio. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## Capítulo V: Artigos Científicos

**P**ara a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, é requerido que o discente realize a submissão de pelo menos dois artigos científicos como primeiro autor em periódico com corpo indexado, sendo um deles aceito. Desse modo, os resultados da pesquisa desenvolvida durante o período de doutorado e a discussão dos resultados serão apresentados em forma de artigos neste Capítulo. O primeiro manuscrito, de autoria de Martina Rossato, Aline Sartório, Antônio Sergio Varella Jr., Elton Pinto Colares e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado ***“Biologia reprodutiva do gastrópode *Stramonita brasiliensis* (Gastropoda: Muricidae)”*** e será submetido em periódico a ser definido. O segundo manuscrito, de autoria de Martina Rossato, Mercia Barcellos da Costa, Ítalo Braga de Castro e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado ***“Season, size and original population: Elucidating effects on imposex assessments”*** e está sob revisão no periódico ***“Ecological Indicators”***. O terceiro manuscrito, de autoria de Martina Rossato, Claude Rouleau e Grasiela Pinho, é intitulado ***“Elucidating the toxic-kinetics of TBT in a gastropod species by whole body autoradiography and in vivo gamma counting”*** e será submetido para publicação no periódico ***“Aquatic Toxicology”***. O quarto manuscrito, de autoria

de Martina Rossato, Vanda Artifon, Gilberto Fillmann e Grasiela Lopes Leães Pinho, é intitulado ***“Avaliação preliminar da influência da presença de matéria orgânica na acumulação do TBT por Stramonita brasiliensis”*** e será submetido em periódico a ser definido.

## 5.1. “Biologia reprodutiva do gastrópode *Stramonita brasiliensis* (Gastropoda: Muricidae)”

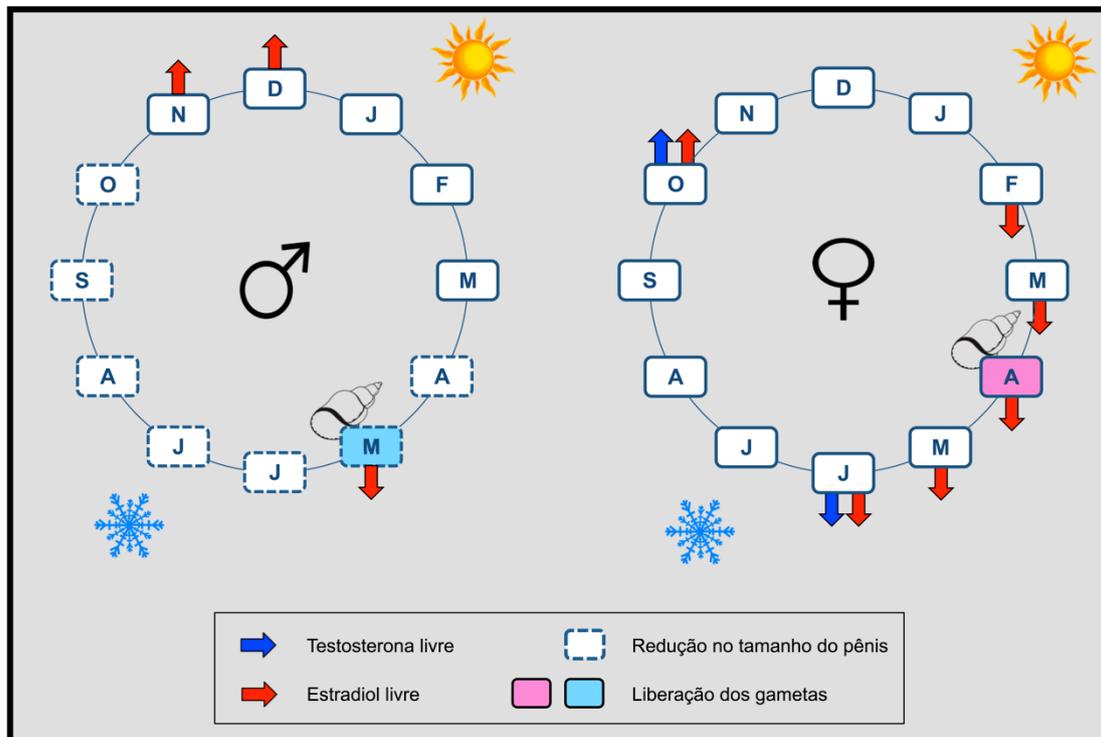
Rossato, M.; Sartório, A., Varella Jr., A.S., Colares, E.P.; Pinho, G.L.L.

### Resumo

O imposex é o surgimento de órgãos sexuais masculinos em fêmeas de moluscos prosobrânquios, causado pela exposição ao tributilestanho (TBT). Este efeito é considerado um dos efeitos de desregulação endócrina mais bem estudadas no mundo e é utilizado como biomarcador de baixo custo para mapear áreas poluídas pelo composto. Sendo o imposex o resultado de uma desregulação endócrina imposta pela exposição ao TBT, conhecer o ciclo reprodutivo da espécie em seu habitat natural é uma das premissas básicas para que se possa compreender a via de ação do TBT nos gastrópodes. Assim, o objetivo deste trabalho foi elucidar o ciclo reprodutivo da *Stramonita brasiliensis* oriunda de uma população do Sul do Brasil. Os parâmetros reprodutivos indicaram um ciclo de variação anual, com cópulas e desovas ocorrendo principalmente no verão e repouso ou baixa atividade reprodutiva durante o inverno, correlacionado com o período de maior temperatura superficial da água do mar e maior período de luz diário. Somado ao conhecimento da biologia reprodutiva da espécie, este estudo prove importantes informações sobre a variação de características biofisiológicas e hormonais intrínsecas da espécie e que uma vez utilizadas na avaliação da contaminação por TBT, podem vir a causar erros de interpretação dos dados. Os resultados obtidos permitem a indicação de períodos preferenciais (início do verão ou início do inverno) para a execução de biomonitoramentos utilizando o imposex, quando tendem ocorrer menores variações nos índices biofisiológicos, reduzindo-se assim, a possibilidade de super ou subestimação dos resultados.

**Palavras-chave:** ciclo reprodutivo, estradiol, histologia, imposex, quantificação hormonal, *Stramonita brasiliensis*, testosterona.

## Resumo gráfico



## Introdução

O gastrópode *Stramonita brasiliensis* é uma das espécies mais comumente utilizadas como bioindicadora da poluição por Tributilestanho (TBT), composto utilizado como biocida em tintas anti-incrustantes durante mais de 30 anos e que atualmente tem seu uso proibido em tintas que revestem embarcações. A espécie é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, nas áreas de entremaré (Ramírez *et al.*, 2009) e submaré (Rilov *et al.*, 2001), aderidas a costões rochosos ou substratos consolidados. Possui hábito alimentar carnívoro e é reconhecidamente sensível aos efeitos masculinizantes (imposex) causados pelo TBT (Castro *et al.*, 2000; Limaverde *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 1990).

O imposex, surgimento de pênis e/ou vaso deferente em fêmeas de gastrópodes, é um biomarcador da poluição por TBT, globalmente conhecido e observado em mais de 260 espécies de gastrópodes (Tittley-O'Neal *et al.*, 2011). As vias de desenvolvimento do fenômeno ainda não são plenamente conhecidas e uma delas atribui o imposex à desregulação endócrina causada

pelo poluente, que seria capaz de interferir no metabolismo dos hormônios andrógenos em moluscos gastrópodes (Janer *et al.*, 2006a; Spooner *et al.*, 1991).

Foi sugerido que o TBT poderia inibir competitivamente a atividade da aromatase P450, impedindo a conversão de andrógenos em estrógenos e, conseqüentemente, aumentar os níveis de testosterona (Bettin *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2002) ou, alternativamente, o TBT poderia inibir a excreção da testosterona (Ronis & Mason, 1996). Mais recentemente, Gooding *et al.* (2003) propuseram que a interferência do TBT no balanço esteroidal se daria na inibição da esterificação da testosterona, levando ao aumento da testosterona livre, que por sua vez induziria o imposex. Apesar de todas essas observações, a existência de receptores e de uma via funcional de sinalização dos andrógenos em moluscos (bem como em outros filos de invertebrados) ainda permanece desconhecida (Markov *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2005; Sternberg *et al.*, 2010). Além disso, a função da testosterona ainda não foi definitivamente estabelecida em invertebrados, porém diversos estudos indicam que ela tenha papel na reprodução e diferenciação sexual dos gastrópodes (Gooding & LeBlanc, 2004; Sternberg *et al.*, 2008). Experimentos administrando testosterona estimularam o desenvolvimento de pênis e/ou vaso deferente em fêmeas de *Nucella lapillus*, *Hinia reticulata* e *Ilyanassa obsoleta* (Bettin *et al.*, 1996; Oberdörster & McClellan-Green, 2000; Spooner *et al.*, 1991) e também estimularam a espermatogênese e ajustaram a oogênese em *Theba pisana* (Sakr *et al.*, 1992). LeBlanc *et al.* (2005) também já mostraram que a testosterona está relacionada com o status reprodutivo dos organismos, e essa variação seria, em parte causada pelas trocas na esterificação da testosterona.

Trabalhos sobre o ciclo reprodutivo de *S. brasiliensis* são escassos na literatura, principalmente envolvendo a análise histológica e a quantificação hormonal. Até o momento são encontrados alguns trabalhos antigos descrevendo desovas e desenvolvimento intracapsular em *S. haemastoma* (Barash & Zenziper, 1980; Butler, 1985; D'Asaro, 1966; Roller & Stickle, 1988) e um estudo recente realizado na Tunísia (Lahbib *et al.*, 2011). Além destes, encontram-se trabalhos com outras espécies da família muricidae do Mediterrâneo (Abidli *et al.*, 2009; Elhasni *et al.*, 2013; Narváez *et al.*, 2002) e do

Oceano Atlântico, mais precisamente na costa de Portugal (Vasconcelos *et al.*, 2008, 2012).

Rossato (2011) induziu imposex em *S. brasiliensis*, após 6 meses de exposição a concentrações ambientais permitidas pela legislação brasileira (10 e 370 ng L<sup>-1</sup> de TBT). Entretanto, ao serem analisados os níveis hormonais dos organismos expostos, além do aumento dos níveis de testosterona causado pelo TBT, foi observado uma alteração hormonal também nos organismos do grupo controle, indicando uma possível variação devido ao seu próprio ciclo reprodutivo. A partir destas observações, foi levantada a hipótese de que os trabalhos de biomonitoramento utilizando *S. brasiliensis* como organismos bioindicador poderiam sofrer influência de alterações morfológicas causadas pelas alterações hormonais intrínsecas ao ciclo reprodutivo da espécie. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações hormonais e biofisiológicas durante o ciclo reprodutivo de *S. brasiliensis*, a fim de reconhecer a influência destas variações nos estudos de biomonitoramento da poluição ambiental por TBT utilizando o imposex.

## Material e Métodos

O estudo foi realizado a partir da coleta mensal (janeiro de 2012 a janeiro 2013) de pelo menos 40 organismos, no costão rochoso da Praia Grande (28°35'35,8" – 48°48'59,0"), Farol de Santa Marta (SC), Brasil. Em laboratório, os organismos foram anestesiados, pesados e medidos antes e após a remoção da concha.

O complexo glândula digestiva-gônada foi avaliado macroscopicamente (Figura 5.1-1), seguindo a classificação de Abidli *et al.* (2012):

- **Imaturo:** quando a gônada não é distinguível da glândula digestiva;
- **Meio maturo:** quando a gônada é distinguível da glândula digestiva pelo seu tamanho e cor, entretanto, ainda é proporcionalmente menor que a glândula digestiva;
- **Maturo:** quando a gônada está desenvolvida e proporcionalmente maior que a glândula digestiva.

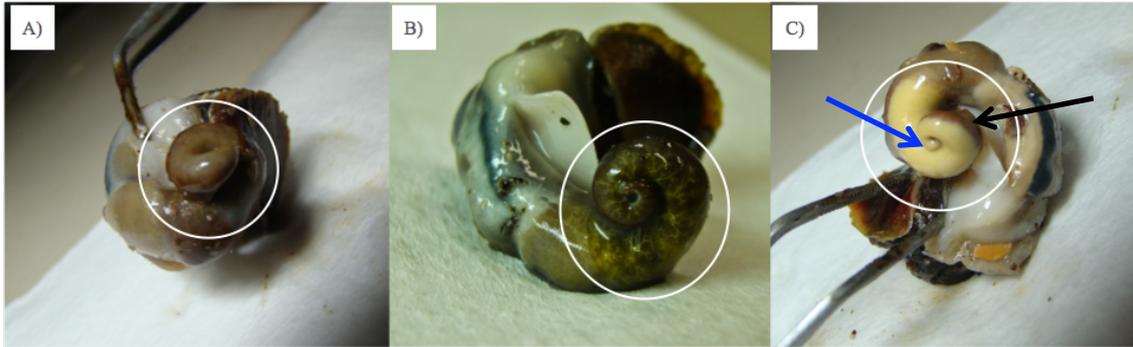


Figura 5.1-1 – *Stramonita brasiliensis*. Complexo glândula digestiva-gônada. Classificação macroscópica utilizada neste trabalho, baseada em Abidli *et al.* (2012): a) Imaturo, b) Meio maturo e c) Maturo. Seta azul: gônada, seta preta: glândula digestiva.

Após a avaliação macroscópica, o complexo glândula digestiva-gônada dos organismos foi pesado separadamente e armazenado para posterior avaliação histológica ou hormonal.

As amostras destinadas à histologia foram mantidas em Paraformol durante no mínimo 2 horas e depois passadas a uma solução de álcool 70%. Já as destinadas a quantificação hormonal foram armazenadas em tubos falcon e congeladas primeiramente em gelo seco e posteriormente em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

### **Análises histológicas**

As análises foram realizadas no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Após fixação, as gônadas foram processadas (desidratação, diafanização e impregnação) no processador automático de tecidos a vácuo (Leica – ASP 200S), sendo incluídas em Paraplast Xtra® (Sigma – P3808). Após a inclusão, foram feitos cortes de  $7\ \mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo motorizado (Leica, RM2255), confeccionando 2 lâminas com 4 cortes para cada amostra que por fim, foram coradas com solução Hematoxilina-Eosina.

Após a coloração, as lâminas foram montadas com bálsamo natural, sendo observadas em microscópio óptico com a magnificação de 400x (Olympus – BX 51) e fotomicrografadas com câmera de alta resolução (Olympus – DP 72).

A identificação dos estágios de desenvolvimento da gametogênese nos cortes histológicos das gônadas de ambos os sexos foi baseada nas escalas de maturação proposta nos trabalhos de Vasconcelos *et al.* (2012) e Narváez *et al.* (2002) adaptada para *S. brasiliensis* e descritas na Tabela 5.1-1.

Tabela 5.1-1 – *Stramonita brasiliensis*. Desenvolvimento gonadal e características de cada estágio de maturidade.

<b>Estágio de maturação</b>	<b>Principais características do desenvolvimento gonadal</b>
<b>Repouso</b>	Poucas e pequenas células germinativas (espermatogônias e ovogônias) dispersas sobre grande quantidade de matriz de tecido conjuntivo frouxo.
<b>Pré-ativo</b>	Gônadas demonstrando o início do desenvolvimento do ácino, ainda dispersas em tecido conjuntivo frouxo, surgem alguns espermátócitos e oócitos pré-vitelogênicos comprimidos na parede do ácino em desenvolvimento.
<b>Ativo</b>	Gônadas aumentando progressivamente de tamanho, o tecido conjuntivo está se condensando, formando ácinos mais compactados; nos machos diversos estágios da espermatogênese estão visíveis (espermátócitos, espermátides e alguns espermatozoides na luz do ácino); nas fêmeas ocorre grande quantidade de oócitos vitelogênicos sendo visível a contínua produção de grânulos de vitelo lipídico.
<b>Maturo</b>	Gônadas estão no seu crescimento máximo e o tecido conjuntivo praticamente desaparece. Os ácinos estão mais agrupados e bem compactados. Nos machos os ácinos encontram-se distendidos estando totalmente preenchidos com espermatozoides. Nas fêmeas o lúmen dos ácinos estão preenchidos totalmente com oócitos maduros, apresentando grande quantidades de grânulos de vitelo lipoproteicos. Neste estágio são visualizados poucos gametas (machos e fêmeas) do desenvolvimento inicial e quando estão presentes localizam-se na parede das gônadas.
<b>Parcialmente desovado</b>	Gônadas diminuem progressivamente pela constante desova. O lúmen se torna gradualmente vazio, colabado, estando circundado por tecido conjuntivo. Mesmo com a diminuição da gametogênese, no lúmen, próximo a parede do ácino, ainda podem haver oócitos ou espermatozoides maduros.

### **Quantificação dos hormônios esteroides**

Os tecidos previamente armazenados foram homogeneizados durante 30 segundos com 2 mL de etanol. O homogenado foi estocado à -70°C por no mínimo 24 horas. Então, os hormônios e seus metabólitos foram extraídos do tecido com 6 mL de etil acetato. A amostra extraída foi dividida em alíquotas com volumes idênticos. Estas alíquotas foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio e uma delas, para quantificação dos hormônios na parcela livre (não esterificado), foi ressuspensa com metanol 80%, lavada com éter de petróleo para remoção da fração lipídica e evaporada sob nitrogênio.

A segunda alíquota, destinada a determinação dos hormônios totais (esterificado + livre), foi saponificada com 1 mL de metanol contendo 1% de hidróxido de potássio e incubada durante 3 horas a 45°C. Em seguida, 4 mL de água ultrapura foram adicionadas a fim de interromper a saponificação e a extração foi realizada com 3 mL de diclorometano. O extrato foi então evaporado sob o fluxo de nitrogênio.

Todos os tubos foram ressuspensados em 600 µL de tampão fosfato (0,05 M, pH 7,6) com gelatina de eletroforese e os hormônios testosterona e 17β-estradiol foram medidos com kits de radioimunoensaio (RIA) (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA). Os níveis hormonais foram quantificados de acordo com o protocolo que acompanha os kits RIA. Curvas padrão foram rotineiramente geradas usando os padrões que acompanham os kits. A porção esterificada de cada hormônio foi calculada como sendo a quantidade de hormônio total menos o hormônio na forma livre. Todos os resultados foram normalizados pelo peso do complexo gonadal.

### **Índices bio-fisiológicos**

A condição corporal (ICC) dos organismos foi avaliada mensalmente através do cálculo:

$$ICC = \left[ \frac{\text{peso mole total (g)}}{\text{peso total (g)}} \right] * 100$$

A evolução mensal do ciclo reprodutivo em ambos os sexos foi avaliada utilizando o Índice Gonadossomático (IGS), calculado para cada indivíduo da seguinte forma:

$$IGS = \left[ \frac{\text{peso do complexo gônada} - \text{glândula digestiva (g)}}{\text{peso mole (g)}} \right] * 100$$

Em machos, o Índice Peniano (IP) foi aplicado afim de caracterizar o período de cópula, bem como eliminar o tamanho-dependência do comprimento do pênis com relação ao tamanho do organismo:

$$IP = \left[ \frac{\text{tamanho do pênis (mm)}}{\text{tamanho total (mm)}} \right] * 100$$

Este índice foi recentemente desenvolvido e empregado em estudos com *Bolinus brandaris* (Vasconcelos *et al.*, 2012, 2011).

### **Análise estatística**

A razão sexual das amostras, expressa pela percentagem de indivíduos de cada sexo e como razão de machos por fêmeas (M:F), foi comparada com paridade (1:1) usando o teste Qui-Quadrado (Teste- $\chi^2$ ). A avaliação macroscópica das gônadas (realizada de forma visual), foi comparada aos resultados obtidos através da análise histológica, utilizando o Qui-Quadrado. Os dados biométricos e hormonais foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e como não obedeceram aos pressupostos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de análise de múltipla comparação para verificar se haviam e onde ocorriam diferenças significativas entre os meses de coleta. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software livre R, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

## Resultados

### Tamanho dos organismos e taxa sexual

Um total de 495 organismos, com tamanhos e pesos variados (8,1 a 55,2 mm e 1,55 a 36 g de peso total) foram analisados neste estudo. O tamanho médio (machos:  $34,7 \pm 5,8$  mm e fêmeas:  $34,9 \pm 5,3$  mm) e o peso médio (machos:  $9,3 \pm 4,7$  g e fêmeas:  $9,4 \pm 4,1$  g) não apresentaram diferenças significativas entre os sexos (comprimento total:  $H = 0,095$ ,  $p = 0,757$ ; peso total:  $H = 0,720$ ,  $p = 0,396$ ).

As fêmeas ( $n=260$ ) predominaram sobre os machos ( $n=235$ ), entretanto não foi observado um significativo desbalanço na razão sexual (M:F = 1:1,  $\chi^2 = 8,86$ ,  $p = 0,635$ ).

### Histologia das gônadas

A frequência mensal de cada estágio de maturidade gonadal revelou a ocorrência simultânea de diversos estágios de desenvolvimento gonadal ao longo do ano (Figura 5.1-2). Durante todo o ano, os machos apresentaram gônadas em estágios mais avançados de maturação com mais frequência (ativo = 36%, maturo = 27%; Figura 5.1-2 a) que as fêmeas (ativo = 15% e maturo = 24%, Figura 5.1-2 b).

Os resultados histológicos indicaram que o desenvolvimento gonadal das fêmeas inicia-se um pouco mais tarde que dos machos, já na primavera, estendendo-se durante o verão. Gônadas em estágio ativo foram encontradas principalmente em Dezembro e Janeiro. Fêmeas maduras foram encontradas em variáveis proporções na primavera, verão e outono, com a maior porcentagem sendo registrada em Dezembro (80%). Gônadas parcialmente desovadas foram observadas em praticamente todos os meses e predominaram sobre os outros estágios durante todo o inverno, sugerindo que este seria o principal período de desova e o início do período de baixo esforço reprodutivo.

Nos machos também foi observada tendência similar. Entretanto, diferentemente das fêmeas, nos machos foram observadas gônadas em estágio ativo a partir de junho, indo até agosto, indicando que o desenvolvimento gonadal dos machos inicia-se antes das fêmeas. Além disso,

nos machos não foi observado gônadas em repouso em nenhum dos meses do ano.

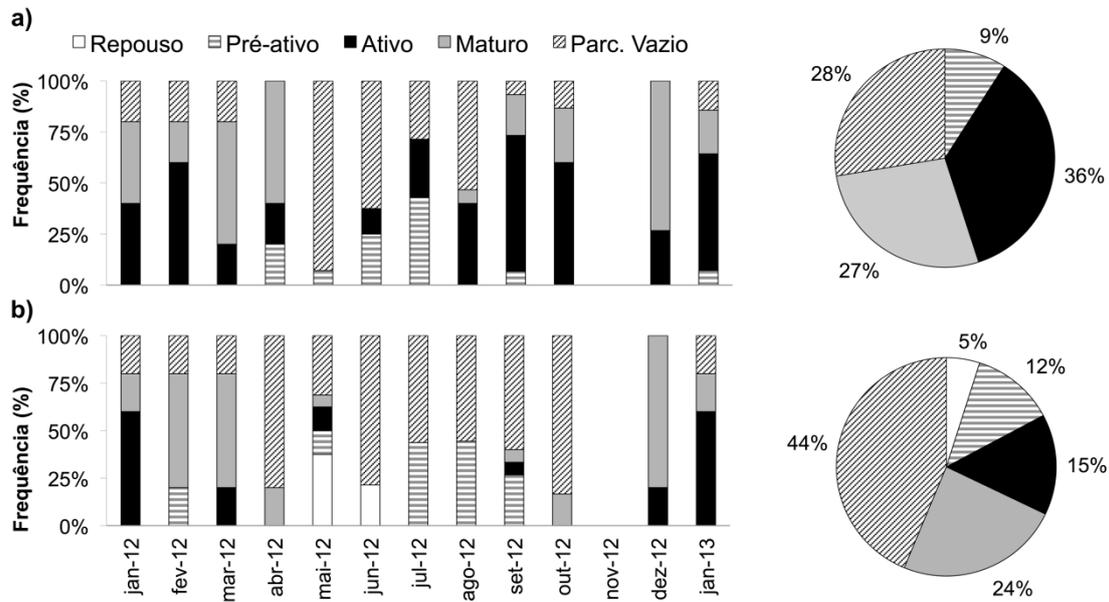


Figura 5.1-2 – *Stramonita brasiliensis*. Variação mensal e frequência anual dos estágios de maturação gonadal a partir da análise histológica, para a) machos e b) fêmeas.

### Avaliação macroscópica x Avaliação histológica

A classificação visual foi correlacionada com os dados obtidos através da análise histológica das gônadas. Para ambos os sexos foram obtidos resultados significativos, conforme pode ser observado em machos e fêmeas na Figura 5.1-3 a e b, respectivamente.

Para os machos, a classificação visual como Imaturo correlacionou-se significativamente com o estágio de Repouso e os Maturados visualmente com os estágios gonadais Ativo e Maturo. Já as fêmeas apresentaram uma correlação significativa entre a classificação visual Imatura e o estágio Parcialmente desovado e os Maturados foram assim classificados tanto quando analisados visualmente como através de histologia.

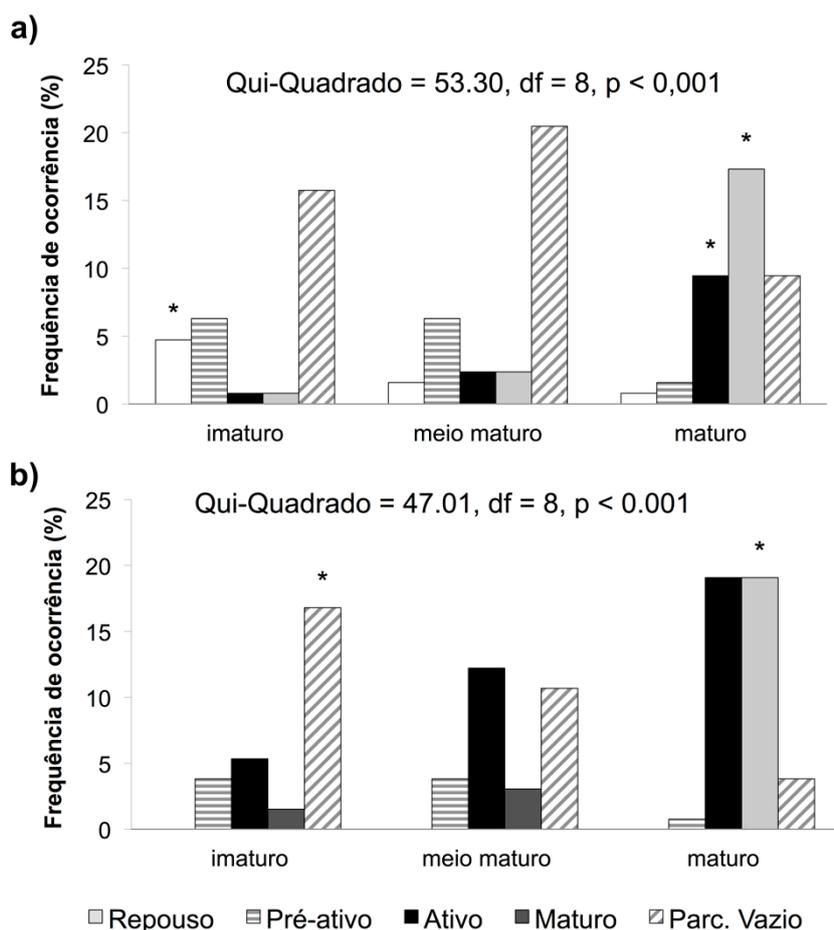


Figura 5.1-3 – *Stramonita brasiliensis*. Correlação entre a avaliação macroscópica (eixo x dos graficos) e os resultados da análise histológica das gônadas (barras). a) fêmeas, b) machos. • significa correlação significativa entre a classificação visual e a histológica.

### Índices bio-fisiológicos

O índice de condição (IC) foi semelhante entre os sexos ao longo do ano ( $H = 0,225$ ,  $p = 0,636$ ) e refletiu o observado nas demais análises. As fêmeas apresentaram uma redução significativa no IC em Julho e machos e fêmeas aumentaram no início do verão.

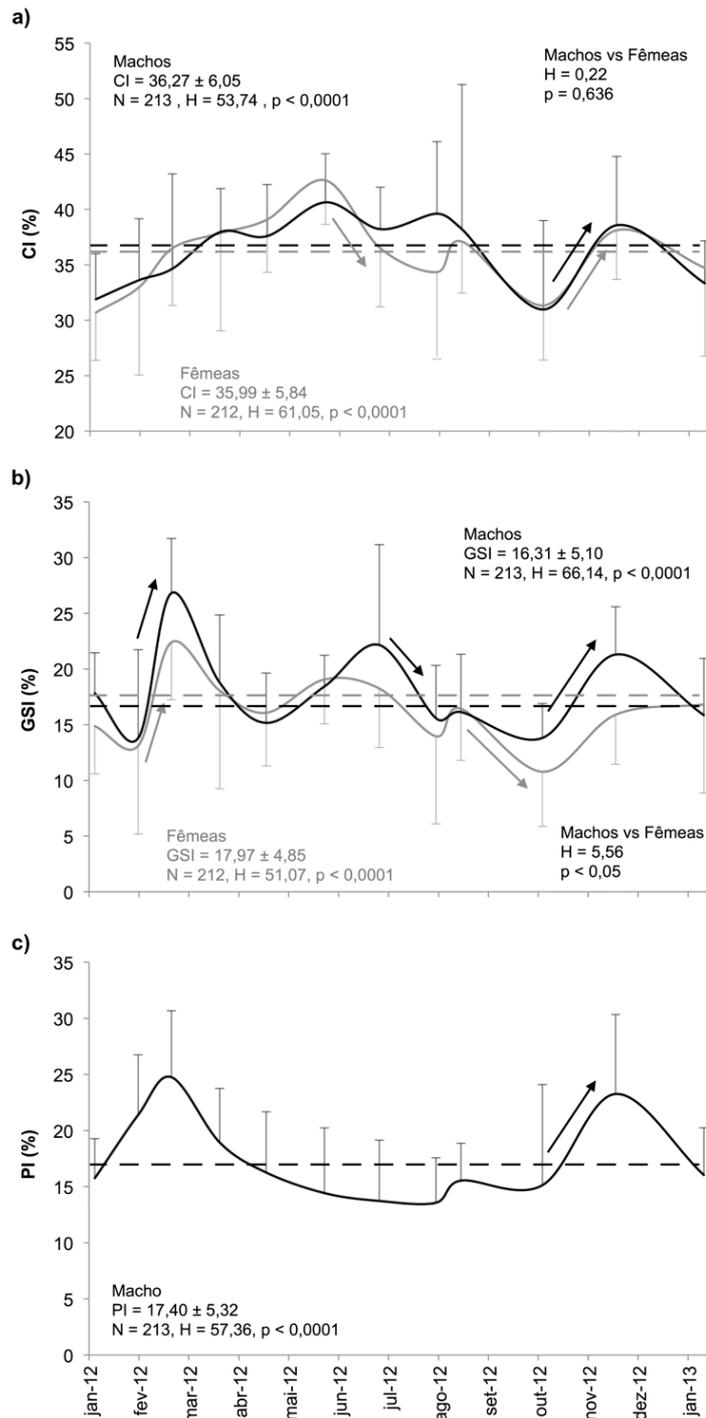


Figura 5.1-4 – *Stramonita brasiliensis*. Variação mensal dos índices bio-fisiológicos: a) Índice de condição (CI), b) Índice gonadossomático (GSI) e c) Índice peniano (PI). A linha cinza bem como os dados em cinza indicam resultados para fêmeas, em preto, para machos. Linhas tracejadas indicam a média anual. As flechas indicam variação significativa entre amostragens consecutivas (Kruskal-Wallis seguido de análise de múltipla comparação,  $p < 0,05$ ).

Os resultados indicaram um alto investimento reprodutivo dos machos ao longo de todo o ano. O índice gonadossomático (IGS) masculino foi, em média, significativamente maior que das fêmeas ( $H = 5,560$ ,  $p = 0,018$ ) (Figura 5.1-4a e b) ao longo de todo o período.

O índice peniano (IP) apresentou uma tendência sazonal ( $H = 57,356$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 5.1-4c), aumentando durante a primavera e verão, atingindo seu máximo em Março e decrescendo continuamente durante o outono e inverno (o menores valores de IP foram registrados em Julho e Agosto). Os maiores valores de IP foram observados em Dezembro e Março (23,3 e 24,76%) e correspondem ao o pico da atividade copulativa masculina, enquanto que os menores valores de IP foram observados durante o inverno e início da primavera.

Como esperado, isto também foi observado no índice gonadossomático (IGS), que indicou que os machos já estariam totalmente preparados para reprodução no início do verão ( $H = 66,148$   $p < 0,001$ ), enquanto que as fêmeas somente apresentam esse pico no final do verão ( $H = 51,068$ ,  $p < 0,001$ ).

### **Fatores ambientais e o *timing* da reprodução**

A maior e a menor temperatura foram registradas em Novembro (19,6°C) e nos 3 meses do inverno (19°C). A temperatura do ar obedeceu o mesmo padrão, porém com uma amplitude de variação maior (mínima de 12,7°C em Julho e máxima de 30,1°C em Fevereiro - Figura 5.1-5). Assim como a temperatura, o fotoperíodo também apresenta a mesma variação, com o menor período de luz ocorrendo em Junho e o maior em Dezembro. Durante o extenso período de atividade gonadal, a maturação das gônadas foi aparentemente desencadeada pela elevação da temperatura durante a primavera. O pico de atividade copulativa (sinalizado pelo IP) ocorreu no verão, mais especificamente em Dezembro e Março, correspondendo exatamente aos meses de maior temperatura.

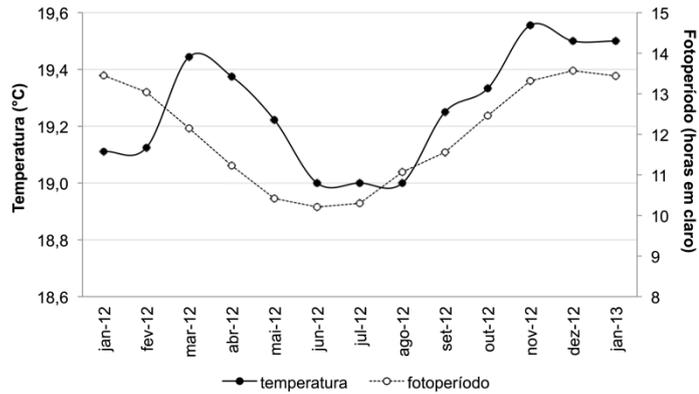


Figura 5.1-5 – Variação mensal da temperatura média superficial da água e do ar e das horas de luz diárias no Farol de Santa Marta (SC), Brasil.

### Níveis dos hormônios esteroides

Os hormônios esteroides são considerados influentes na determinação sexual dos moluscos. Os resultados deste estudo (Figura 5.1-6) mostraram que *S. brasiliensis* é capaz de controlar a esterificação da testosterona em ambos os sexos, de forma que os níveis de testosterona livre permaneçam constantes, aumentando e reduzindo significativamente no início da maturação das gônadas femininas e no início do período de repouso, respectivamente. Estes resultados suportam a hipótese de Gooding & LeBlanc (2004) de que a esterificação da testosterona serviria para sequestrar o excesso do hormônio e mantê-lo inativo. Este mecanismo de regulação sanaria então a sua necessidade nos períodos de reprodução, sem que o organismo precisasse aumentar a síntese de hormônio.

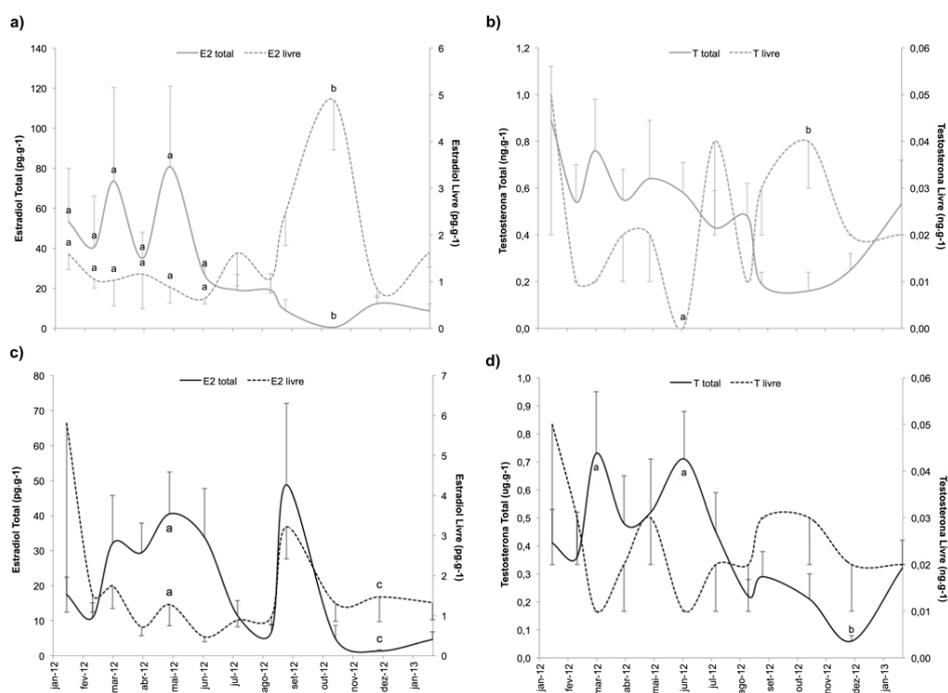


Figura 5.1-6 – *Stramonita brasiliensis*. Dosagem hormonal do complexo gonadal. a) Estradiol em fêmeas; b) Testosterona em fêmeas; c) Estradiol em machos e d) Testosterona em machos. Linhas cheias indicam hormônio total, linhas tracejadas indicam hormônio na forma livre. Barras indicam Erro Padrão. Letras mostram presença de diferença significativa (Kruskal-Wallis seguido de análise de múltipla comparação,  $p < 0,05$ ).

## Discussão

De forma geral, os aspectos mais relevantes observados da reprodução de *Stramonita brasiliensis* foram o longo desenvolvimento gonadal com ciclo sincronizado entre fêmeas e machos e a ocorrência simultânea de distintos estágios gametogênicos em ambos os sexos ao longo de praticamente todo o ano. Estudos prévios com *Bolinus brandaris* reportaram longos períodos de atividade gametogênica (principalmente em machos) (Narváez *et al.*, 2002; Ramón & Amor, 2002), com conseqüente curto período de repouso no ciclo reprodutivo, ocorrendo entre o verão e o outono. Em *S. brasiliensis*, não foram observados machos em repouso em nenhuma estação do ano e as fêmeas apresentaram este estágio apenas em Maio e Junho.

Foi observada uma suave assincronia entre o pico de liberação de gametas masculinos e a desova feminina, que é observado também em estudos com outras espécies de gastrópodes (Narváez *et al.*, 2002; Ramón & Amor, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2008, 2012). *S. brasiliensis* é uma espécie

com fecundação interna, sendo assim, a alta frequência de machos maduros e a ausência de machos em repouso, indicam a tentativa de aumento do sucesso reprodutivo através de um número maior de cópulas (Ramón & Amor, 2002). Após a cópula, as fêmeas podem estocar esperma viável no receptáculo seminal durante um longo período antes da fertilização do oócitos pelo esperma e da desova (Fretter & Graham, 1994).

Além disso, o estágio mais frequentemente encontrado entre as fêmeas ao longo do ano foi o de gônada parcialmente desovada e pode ser interpretado como a capacidade das fêmeas em controlar a desova, realizando a postura quando as condições do ambiente são favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos ovos e embriões como foi também observado em *B. brandaris* (Vasconcelos *et al.*, 2012).

O desenvolvimento gonadal inicia-se no final da primavera e ocorre durante todo o verão, quando as temperaturas tanto da água quanto do ar estão em elevação. A temperatura e a disponibilidade de alimento são fatores de forte influência na cópula e desova de gastrópodes, inclusive podendo causar variações de ano pra ano em diversas espécies (Sternberg *et al.*, 2010). Em um breve estudo realizado com machos e fêmeas na Ilha do Mel (PR) (Carvalho *et al.*, 2016), também foi observada a tendência de redução no tamanho das gônadas no inverno e o aumento na frequência de gônadas maduras e presença de posturas durante o verão. Entretanto, a correlação entre os meses quentes do ano e a estação de desova não é uma característica geral para os prosobrânquios que habitam regiões de águas temperadas (Ramón & Amor, 2002) e isto já foi demonstrado para algumas espécies (*C. concholepas* – (Ramorino, 1975), *Nassarius reticulatus* – (Barroso & Moreira, 1998) e *Buccinum undatum* (Kideys *et al.*, 1993). A dinâmica reprodutiva dos gastrópodes, incluindo a regulação do desenvolvimento gonadal, gametogênese, cópula e desova são controladas por sinais ambientais, que permitem que a reprodução ocorra em condições ambientais favoráveis (Harding *et al.*, 2008; Hotchkiss *et al.*, 2008; Wayne, 2001). *S. brasiliensis* tem hábito alimentar carnívoro, alimentando-se preferencialmente de cracas, mexilhões, poliquetas tubícolas e ostras (Lavrado, 1992). Em todas as coletas deste trabalho foi observada grande disponibilidade de alimento

(mexilhões) no costão, possivelmente contribuindo para a grande frequência de desova, mesmo que em intensidades diferentes, ao longo de todo ano.

Neste estudo, as desovas foram observadas durante as coletas de janeiro até abril. Na população de *S. haemastoma* da costa da Tunísia, Lahbib *et al.* (2011) encontraram desovas no final de Abril ao início de Agosto de 2007 (verão no Hemisferio Norte), enquanto que Barash & Zenziper (1980) e Roller & Stickle (1988) observaram desovas de Fevereiro a Novembro e de Abril a Junho em populações da costa de Israel e da Louisiana, respectivamente. Essa variabilidade no período de desova pode estar relacionada a fatores ambientais como a temperatura da água, salinidade e disponibilidade de comida, mas também a diferenças genéticas entre populações. Por exemplo, *Nucella lapillus* pode ter reprodução ao longo de todo ano, mas em alguns lugares a reprodução esta restrita a poucos meses (Feare, 1970).

As concentrações de testosterona e 17 $\beta$ -estradiol no complexo gonadal de *S. brasiliensis* foram semelhantes as reportadas em estudos com outros gastrópodes (0,1 a 1,2 ng g<sup>-1</sup> de testosterona e 1 a 140 pg g<sup>-1</sup> de estradiol). Ambos os hormônios foram encontrados principalmente na forma esterificada (média de 83 para estradiol e 82% para testosterona), confirmando o que foi encontrado em estudos com outras espécies de gastrópodes, como *I. obsoleta* (Gooding *et al.*, 2003), *M. cornuaretis* (Janer *et al.*, 2006a; Lyssimachou *et al.*, 2008), *N. lapillus* (Santos *et al.*, 2005) e *H. trunculus* e *B. brandaris* (Abidli *et al.*, 2012). Entretanto, contrário a Abidli *et al.* (2012), que encontraram hormônios livres representando até no máximo 9% dos níveis totais dos hormônios, para *S. haemastoma* os hormônios livres representaram entre 0,1 – 86% do total de estradiol e 0,6 – 80% do total de testosterona. Além disso, os níveis de hormônios livres obtidos no presente trabalho apresentaram uma variação consideravelmente maior do que encontrada no estudo de Schulte-Oehlmann *et al.* (1995) em fêmeas de *M. cornuaretis*: 0,5 – 1,9 ng g<sup>-1</sup> de testosterona livre e 0,02 – 0,12 ng g<sup>-1</sup> de estradiol livre. Estes resultados indicam que *S. brasiliensis* pode ter um ciclo reprodutivo altamente controlado pela sua capacidade de esterificar o excesso de hormônios livres, controlando assim o período de atividade sexual e desova. Esse excesso de hormônios na forma livre seria convertida em ácidos graxos esterificados pela ação da Acil-

CoA:testosterona aciltransferase (ATAT) e então estocados pelos organismos (Gooding *et al.*, 2003; Janer *et al.*, 2006b).

Que o TBT está diretamente ligado ao surgimento do imposex está plenamente estabelecido, entretanto, a forma como ele altera a dinâmica dos hormônios esteroides ainda não (Abidli *et al.*, 2012). Apesar de estudos prévios terem indicado que *S. brasiliensis* sofre alterações hormonais pela exposição ao TBT (Rossato, 2011), estudos com outros gastrópodes, como o de Lyssimachou *et al.* (2009) e Abidli *et al.* (2012) mostraram significativas diferenças no metabolismo da androstenediona (precursor androgênico) em *H. trunculus* e *B. brandaris*, indicando que existem diferenças metabólicas entre as espécies. Para *S. brasiliensis* não existem estudos deste tipo na literatura.

Poucos estudos buscaram avaliar o papel fisiológico dos esteroides sexuais na reprodução dos gastrópodes através da quantificação dos níveis hormonais e da sua correlação com o status reprodutivo dos organismos (Sternberg *et al.*, 2010). Assim como no estudo de Gooding & LeBlanc (2004), com *I. obsoleta*, os níveis hormonais foram semelhantes entre machos e fêmeas ao longo do ano ( $H = 1,75$ ,  $p = 0,185$ ). Entretanto, diferente do observado nos trabalhos previamente citados, onde os picos de testosterona livre ocorreram a partir do aquecimento do hemisfério norte, entre abril e novembro (início e final do período reprodutivo de *I. obsoleta*), para as fêmeas de *S. brasiliensis* foi observado um decréscimo significativo nos níveis de testosterona livre em Junho e um aumento significativo em Outubro (início do período de menor investimento reprodutivo e início da maturação gonadal, respectivamente). Os níveis de testosterona total não variaram nos machos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Sternberg *et al.* (2008) e sugerem que a testosterona pode ter um papel importante no restabelecimento do desenvolvimento gonadal masculino. Os níveis de estradiol total em ambos os sexos apresentou-se elevado durante o período de maturação gonadal (verão), com marcada redução no final do período de repouso ou baixo investimento reprodutivo.

A variação do ciclo reprodutivo em *S. brasiliensis* também reflete no comprimento médio do pênis nos machos, que aumentou continuamente nos períodos de maturação gonadal e diminuiu depois da cópula. Assim como em *B. brandaris*, a variação do comprimento do pênis através do ciclo reprodutivo

pode ser uma forma simples e útil de se obter informações sobre a maturação dos machos e sua atividade reprodutiva (Vasconcelos *et al.*, 2011). Em geral, os neogastropodos possuem um ritmo anual na renovação do trato reprodutivo e órgãos sexuais secundários (Hotchkiss *et al.*, 2008). A variação sazonal no comprimento do pênis ou a regressão no final do período reprodutivo, já foi descrita para vários gastrópodes marinhos como para *Hexaplex trunculus* (Vasconcelos *et al.*, 2008), *Thais clavigera* (Chan *et al.*, 2008), *Littorina littorea* (Van Den Broeck *et al.*, 2009) e *Nucella lapillus* (Galante-Oliveira *et al.*, 2009). Esta variação no comprimento do pênis tem importantes implicações nos estudos de biomonitoramento utilizando o imposex. Um dos parâmetros utilizados para mensurar o impacto na população de gastrópodes é o RPLI (*Relative Penis Length Index*) que é calculado pelo comprimento do pênis das fêmeas imposexadas / comprimento médio do pênis dos machos x 100 (Gibbs & Bryan, 1987). Uma possível solução para evitar erros na estimação da severidade do imposex seria a realização do biomonitoramento sempre no mesmo mês ou período do ciclo reprodutivo da espécie estudada (Tittley-O'Neal *et al.*, 2011). Entretanto, até a realização deste trabalho, nenhum estudo havia sido realizado caracterizando o ciclo de *S. brasiliensis* no Brasil.

## **Conclusão**

Esse foi o primeiro estudo sobre a biologia reprodutiva de *Stramonita brasiliensis* com quantificação dos níveis de hormônios sexuais e o primeiro estudo sobre o ciclo reprodutivo da espécie no Brasil.

De modo geral, os parâmetros reprodutivos de *S. brasiliensis* do Farol de Santa Marta (SC), indicaram um ciclo de variação anual, com cópulas e desovas ocorrendo principalmente no verão e repouso ou baixa atividade reprodutiva durante o inverno, correlacionado com o período de maior temperatura superficial da água do mar e maior período de luz diário.

Somado ao conhecimento da biologia reprodutiva da espécie, este estudo provém importantes informações sobre a variação de características biofisiológicas e hormonais intrínsecas da espécie e que uma vez utilizadas na avaliação da contaminação por TBT, podem vir a causar erros de interpretação dos dados. A semelhança entre os resultados baseados nas observações macro e microscópicas foram altas. Sendo assim, podemos indicar que os

estágios observados macroscopicamente provém informação suficiente sobre o ciclo reprodutivo de *S. brasiliensis* e podem ser usados quando uma descrição detalhada das estruturas não é necessária, como no caso de biomonitoramentos da contaminação por TBT, utilizando o imposex. Os resultados obtidos permitem a indicação de períodos preferenciais (início do verão ou início do inverno) para a execução de biomonitoramentos em regiões de clima temperado. Neste período tende a ocorrer menores variações nos índices bio-fisiológicos, reduzindo-se assim, a possibilidade de super ou subestimação dos resultados. Mais estudos ainda precisam ser realizados em regiões de clima tropical, para avaliar se a estratégia também se aplica nesses ambientes.

## 5.2. “Season, size and original population: Elucidating effects on imposex”

M. Rossato<sup>1</sup>, M.B. Costa<sup>2</sup>, I.B. Castro<sup>3</sup>, G.L.L Pinho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Oceanografia. Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática, Universidade Federal do Rio Grande, C.P. 474, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas. Laboratório de Malacologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES 29040-090, Brazil

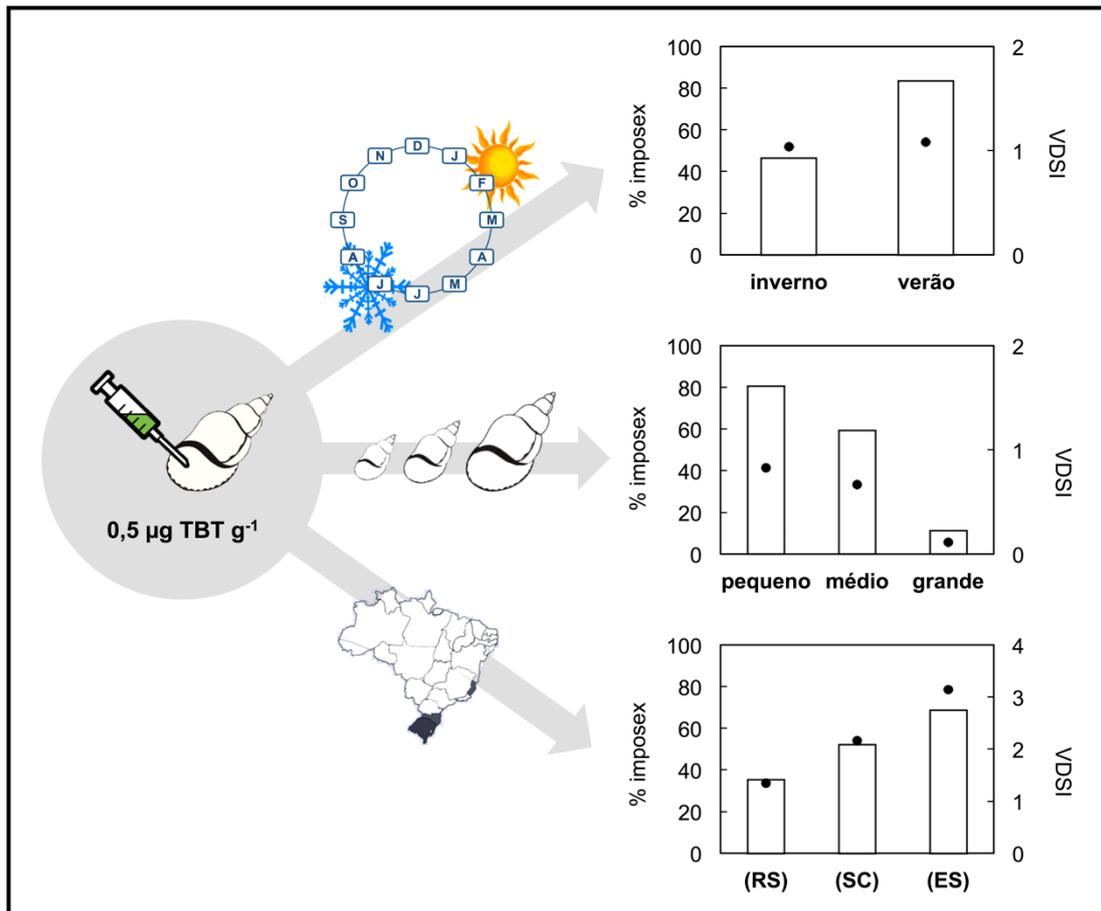
<sup>3</sup>Departamento de Ciências do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Santos, SP 11030-400, Brazil

### Abstract

Through controlled exposure to tributyltin (TBT), we evaluated the effects of season, size, and origin on imposex in the predatory sea snail *Stramonita brasiliensis*. We carried out four experiments on organisms collected from three different sites on the Brazilian coast (Torres (Rio Grande do Sul), Farol de Santa Marta (Santa Catarina), and Aracruz (Espírito Santo). Female *S. brasiliensis* snails were injected in the foot muscle with 0.5 µg TBT·g<sup>-1</sup> and maintained in aquariums with clear marine water under controlled laboratory conditions. One month after injection, the females were anesthetized, weighed, measured, and classified as small (< 30 mm), medium (≥ 30 to ≤ 40 mm), or big (> 40 mm). We then assessed imposex development. The *S. brasiliensis* population from the southeast (tropical) region was more sensitive to TBT than the population from the south of Brazil (the temperate region). We found greater sensitivity in the small and medium categories. Females were also more susceptible to TBT when exposed during their reproductive period. The main results are discussed with regard to the use of imposex as a biomarker of TBT pollution. We also highlight the need to ensure that the intrinsic biological factors of the organisms are considered in such biomonitoring studies to avoid bias in interpreting the results.

**Keywords:** biomonitoring, imposex, season, size, *Stramonita brasiliensis*, population

## Graphical abstract



## Introduction

Imposex is the imposition of male sexual characteristics onto female gastropods (Smith, 1971), and has been described in over 250 prosobranch species (Titley-O'Neal *et al.*, 2011). This masculinization, which is caused by exposure to tributyltin (TBT), has been regarded as the most complete example of endocrine disruption by an environmental pollutant (Matthiessen & Gibbs, 1998; Vos *et al.*, 2000)

TBT is an organometallic compound and owing to its biocidal properties, since 1950 it has been used as an active ingredient in wood preservatives, pesticides, and marine antifouling paints to prevent biofouling (Hoch, 2001). Since 2008, its toxic effects on non-target aquatic organisms, such as bivalves, gastropods, fish, and marine mammals, has led to a total ban of its use in antifouling paints by the International Marine Organization (IMO) (IMO, 2001). International regulations against the use of TBT-based antifouling paints have

caused a reduction in recent TBT input. In this regard, the authors of many studies have reported a decrease in TBT concentrations and biological effects worldwide (Bray *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2012b; Langston *et al.*, 2015).

Although there has been some progress in recent years in this area, the problem is still significant. The effects of TBT on gastropods have been widely studied, and imposex is one of the best studied phenomena (Bigatti *et al.*, 2009). Imposex is the superimposition of male sexual characters – the development of a penis and vas deferens – in female gastropods (Smith, 1971), and has been reported to cause sterility and a consequent decline of entire populations in coastal areas. In recent years, the incidence of imposex has been widely used as a specific biomarker, especially in species showing a good correlation between morphological alterations and environmental TBT levels (Titley-O’Neal *et al.*, 2011). Several gastropod species have been proposed worldwide as bioindicators of TBT pollution, despite their differences in size, physiology, distribution, and sensitivity to pollutants (Anastasiou *et al.*, 2016).

In Latin America, the first study to investigate the incidence of imposex at sites adjacent to point sources took place in 2000. The primary species used in imposex studies are *Stramonita brasiliensis*, *Adelomelon brasiliana*, *Stramonita rustica*, and *Strombus gigas* (Titley-O’Neal *et al.*, 2011). In Brazilian coastal areas, *Stramonita brasiliensis* (Claremont *et al.*, 2011) has been used regularly as a bioindicator species of coastal TBT pollution (Castro *et al.*, 2012a).

The use of imposex in gastropods as indicators of TBT pollution has some advantages over chemical analysis of TBT in water, sediment, or even biological tissue. Biomonitoring may overcome some of the difficulties related to the chemical measurement of TBT in environmental samples. Such difficulties mainly consist of the large temporal variations in the levels of this compound at fixed locations. Furthermore, imposex may occur at TBT concentrations below the limit of detection (Bryan *et al.*, 1988; Gibbs *et al.*, 1987; Gooding *et al.*, 2003). Moreover, the use of imposex as an indicator is a low-cost technique and a biologically meaningful measurement that reveals the effects of a pollutant on an ecosystem at the individual, population, and community levels (Barroso *et al.*, 2000).

Traditional imposex monitoring techniques use imposex parameters to quantify the response of gastropod populations (Gibbs & Bryan, 1994;

Oehlmann *et al.*, 1996), allowing the comparison of different environments (Toste *et al.*, 2013). However, several experimental studies have demonstrated the differential sensitivity of gastropod species to TBT exposure. Furthermore, the authors of a few studies have reported variations in imposex responses among organisms of different sizes and/or ages (Mensink *et al.*, 2002, 1996; Santos *et al.*, 2006), and stages of reproductive maturation (McClellan-Green *et al.*, 2007).

In the present work, we evaluated the effects of season, size, and origin on imposex in the predatory sea snail *S. brasiliensis* from the Brazilian coast (south and southeast) through controlled exposure to TBT. The main results are discussed with regard to the use of imposex as a biomarker of TBT pollution, and the need to ensure that the intrinsic biological factors of the organisms are considered in such biomonitoring studies to avoid bias in interpreting the results.

## **Material and methods**

### **Animals**

At least 344 *S. brasiliensis* snails (Mollusca: Prosobranchia: Muricidae) (> 19 mm in length) were manually caught from three different coastal sites in South and Southeast Brazil (Torres (RS); Farol de Santa Marta (SC), and Aracruz (ES)) (Figura 5.2-1). After sampling, the gastropods were acclimated under laboratory conditions over 2 weeks, and sexed by pulling gently on the anesthetized animal's operculum until it was possible to see the entrance of the palial cavity and the presence or absence of the penis. Only females were used in the experiment. Previous analyses performed in the same sites indicated a total absence of imposex in all the areas studied.



Figura 5.2-1 – Location of sampling sites on the Brazilian coast.

### Exposure experiment

Tributyltin (TBT) was purchased from Sigma Aldrich. A stock solution ( $4.8 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ ) was prepared in ethanol and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark before use. The same solution was used in all exposure experiments.

The snails were anesthetized with 7% (w/v) magnesium chloride solution, weighed, and injected in the foot muscle with a unique dose comprising an ethanolic solution of TBT ( $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ ). We used two control treatments: without injection and injection with a volume of pure ethanol equal to that used for the TBT solution injections. After injection, the snails were kept for 30 days in aerated 10 L aquariums (separated according to treatment) supplied with natural filtered saltwater at  $20^{\circ}\text{C}$  under a 12-h light-dark cycle. Before and during the experiments, the gastropods were fed with mussels (*Perna perna*) or small gastropods (*Tegula viridula*) caught from the same site as the *S. brasiliensis* snails. The aquarium saltwater was renewed twice per week.

### Experimental design

Experiments were performed to evaluate the influence of season and size on the imposex responses of *S. brasiliensis*. Furthermore, imposex levels

were compared among different populations distributed along the coast of South and Southeast Brazil; four exposure experiments were named and established as in Figura 5.2-2:

Experiment A	Experiment B	Experiment C	Experiment D
Organisms from: Farol de Santa Marta (SC)	Organisms from: Farol de Santa Marta (SC)	Organisms from: Torres (RS)	Organisms from: Aracruz (ES)
Winter	Summer	Summer	Summer
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Small</li> <li>• Medium</li> <li>• Big</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Small</li> <li>• Medium</li> <li>• Big</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medium</li> <li>• Big</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medium</li> <li>• Big</li> </ul>

Figura 5.2-2 – Experimental design.

The size class was established based on the total shell length (SL): small (< 30 mm), medium ( $\geq 30$  to  $\leq 40$  mm), or big (> 40 mm). All experimental procedures were conducted under the same laboratory conditions described above.

### Biological analysis

After 30 days of exposure, the snails were anesthetized and the SL of each snail was measured to the nearest 0.1 mm using vernier callipers. The snails were subsequently classified as small, medium, or big. The soft bodies were extracted after breaking the shell using a bench vice. The soft parts and gonads were weighed and imposex parameters were assessed. Subsequently, we made the following calculations: the general condition index (CI) = soft parts weight (SPW) / total weight; the gonadosomatic index (GSI) = gonad weight / SPW; the imposex incidence (I%) = the percentage of imposex-affected females compared with the total number of females in the sample; the female penis length (FPL) = mean of the female penis length; vas deferens stages (VDS) were assessed according to the schemes proposed by Stroben *et al.* (1992) and partially modified for *S. brasiliensis* by Toste *et al.* (2013) and the vas deferens sequence index (VDSI) = the sum of VDS stages of all females / the total number of females, following Gibbs *et al.* (1987).

## Statistical analysis

CI, GSI, and FPL values are reported as mean  $\pm$  SE (standard error) of the mean. Data were first tested for normality and homogeneity of variance using the Shapiro–Wilks and Levene tests, respectively. Differences between treatments were determined by one-way or factorial analysis of variance (ANOVA) and, if the assumptions were not met, the non-parametric Kruskal–Wallis test was performed. Statistical analyses were carried out using the RStudio software package (RCoreTeam, 2013). Effects were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Seasonal variation in imposex parameters

A total of 149 *S. brasiliensis* snails collected from Farol de Santa Marta (SC) in winter and summer (Experiments A and B, respectively) were exposed to TBT by injection ( $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$  of TBT). SL varied significantly (Kruskal–Wallis,  $H = 274.36$ ,  $p < 0.000001$ ), from 19.1 to 55.0 mm; 75 snails were classified as small, 53 as medium, and 21 as big. The imposex parameters (% imposex, VDSI, and FPL) obtained from these experiments (winter and summer) are shown in Figura 5.2-3 a and b.

The incidence of imposex in winter (Experiment A) varied between 14 and 67%, whereas VDSI ranged from 0.14 to 0.71. Females did not develop a measurable penis in winter. In summer (Experiment B), imposex induction was most pronounced in winter, although big females did not develop imposex. At the end of Experiment B, small and medium females presented 100 and 89% imposex induction, with VDSIs of 1 and 1.11, and female penis lengths (FPLs) of 0.2 and 0.24 mm, respectively.

The results obtained from the ethanol control treatment group (not shown) do not differ from those obtained from the control group, suggesting that injection and solvent do not promote imposex.

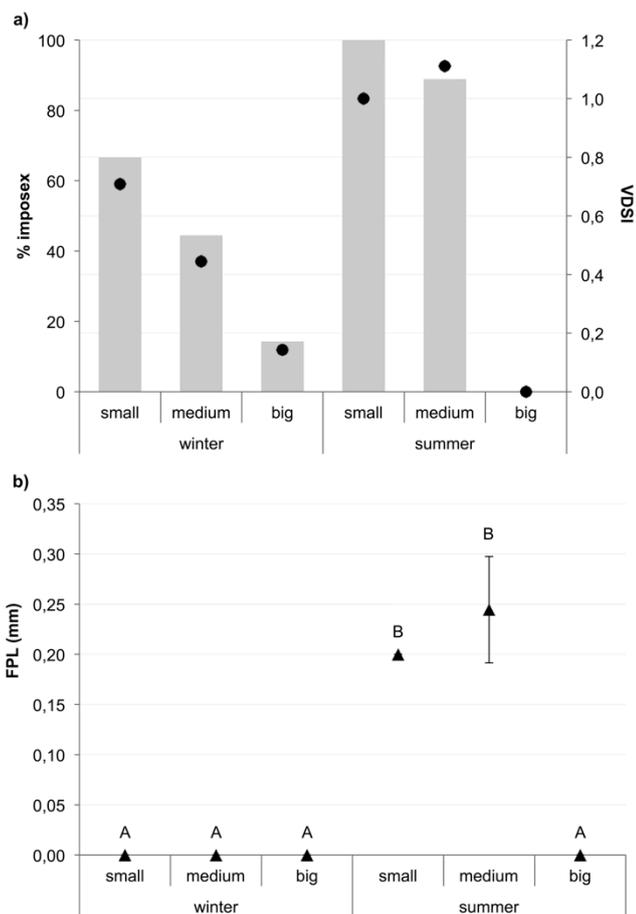


Figura 5.2-3 – *Stramonita brasiliensis*. Imposex parameters obtained for *Stramonita brasiliensis* snails with different shell sizes exposed to tributyltin (TBT) by injections of  $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$  in experiments performed during winter and summer. a) % imposex (gray bars, left axis) and vas deferens sequence index (VDSI; circles, right axis); b) Female penis length (FPL; mm, triangles). (A, B) denote statistically significant differences ( $p < 0.0001$ ) between sizes and/or seasons.

The variations in CI and GSI in the gastropod females exposed to TBT during winter and summer are summarized in Figura 5.2-4 a and b. Regarding the influence of size, we observed a significant difference in CI in the small females exposed during summer. CI was significantly lower in small females exposed to TBT in comparison with small females from the control treatment. We did not detect any inter-size differences in CI in winter. Similarly, there was no difference in CI between seasons in the experiments.

All sizes in both experiments (with the exception of big snails in summer) showed a reduction in GSI, highlighting that in winter, there was a significant reduction (Kruskal–Wallis,  $H = 24.18$ ,  $p < 0.05$ ) in GSI due to TBT exposure in small and medium females.

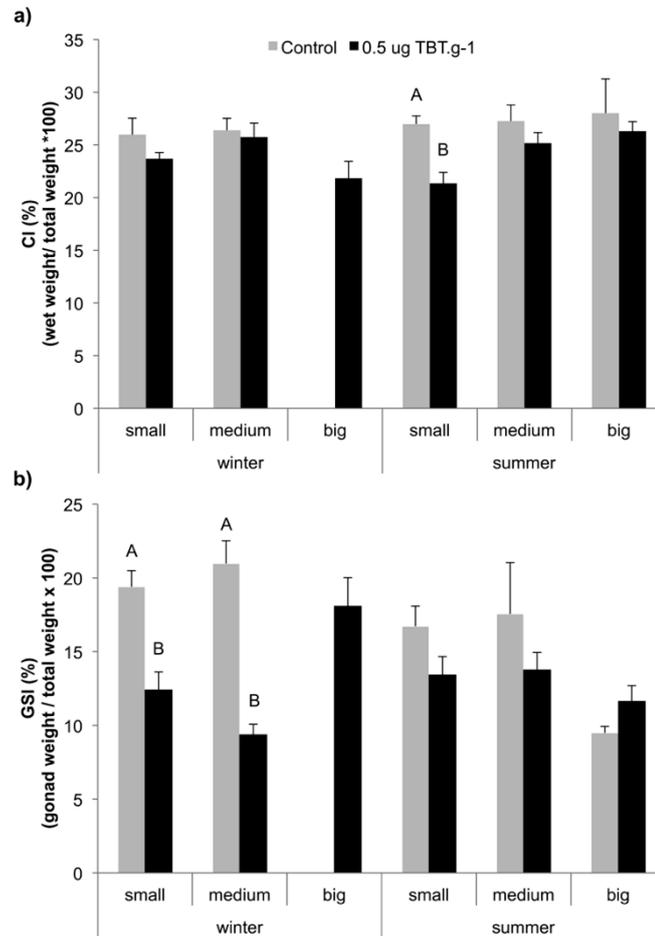


Figura 5.2-4 – *Stramonita brasiliensis*. Results obtained for *Stramonita brasiliensis* snails of various sizes from Farol de Santa Marta (SC) exposed to tributyltin (TBT) by injections of 0.5 µg TBT g<sup>-1</sup>, in experiments performed during winter and summer. a) Condition index (CI) + E.P; b) Gonadosomatic index (GSI) + E.P. (A, B) denote statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments in each size. There was no control for the big snails in the winter experiment.

### Influence of the size in imposex parameters

To evaluate the influence of size on imposex parameters, we opted to use only the results from the 149 snails collected in Farol de Santa Marta (SC) (Experiments A and B), thereby avoiding complications due to population origin. The values of % imposex, VDSI, and FPL from all injected snails in the two experiments (winter and summer) are shown in Figura 5.2-3, and are grouped by size in Figura 5.2-5. We observed higher % imposex and VDSI in the small (80%, 0.83) and medium (59%, 0.67) females. Big females clearly presented lower imposex levels (11%, 0.11). FPL was significantly higher in the medium

than in the small snails (one-way ANOVA,  $F = 8,65$ ,  $p < 0.05$ ). Big females did not develop measurable penises.

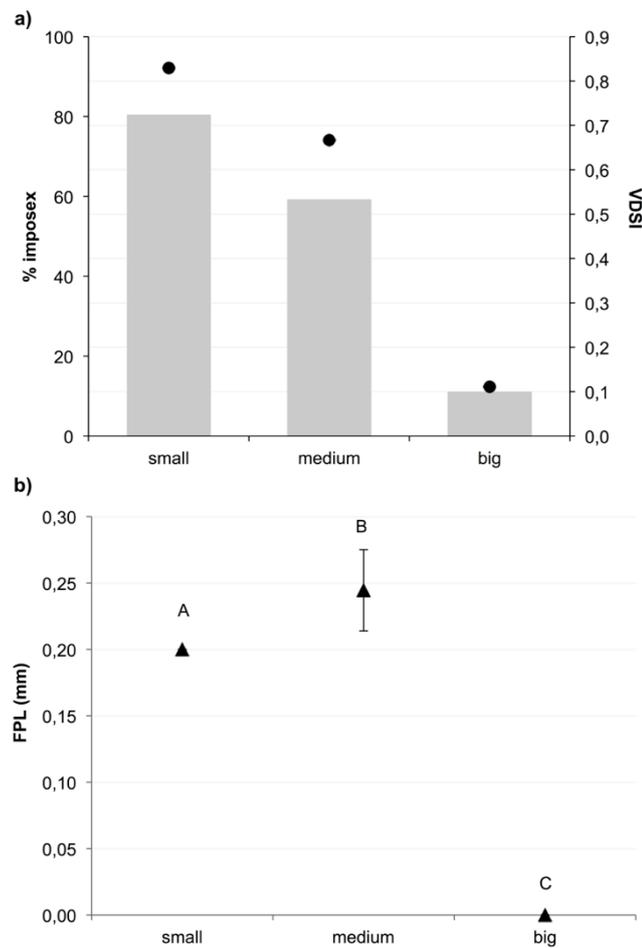


Figura 5.2-5 – *Stramonita brasiliensis*. Results for all female *Stramonita brasiliensis* snails from Farol de Santa Marta (SC) (classified by size) exposed to tributyltin (TBT) by injections of  $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ . a) % imposex (gray bars, left axis) and vas deferens size index (VDSI; circles, right axis); b) female penis length (FPL; mm, triangles). (A, B, C) denote statistically significant differences between sizes (A–B  $p < 0.05$ ; A/B–C  $p < 0.01$ ).

### Effect of population variation on imposex parameters

We grouped the results obtained from all the summer experiments (Experiments B, C, and D) to evaluate the influence of animal origin on imposex responses; we analyzed 85 snails from Torres (RS), 79 from Farol de Santa Marta (SC), and 68 from Aracruz (ES). Apart from the significant difference in SL between the size classes, big snails from Torres (RS) (41.2 mm) had shells

that were significantly smaller (factorial ANOVA,  $F = 9.33$ ,  $p < 0.001$ ) than big snails from Aracruz (ES) (47.1 mm).

Imposex incidence (I%) in these three experiments varied from 0 to 100% when the snails were categorized by size (Figura 5.2-6 a). Imposex was induced in 35% of the females from Torres, 52% from Farol de Santa Marta, and 69% from Aracruz (mean of all snails from each population). VDSI ranged from 1.35 to 3.14, with higher levels observed in snails from Aracruz. Female snails from Aracruz had significantly larger FPLs (one-way ANOVA,  $H = 4.76$ ,  $p < 0.05$ ) than snails from Torres or Farol de Santa Marta (Figura 5.2-6b).

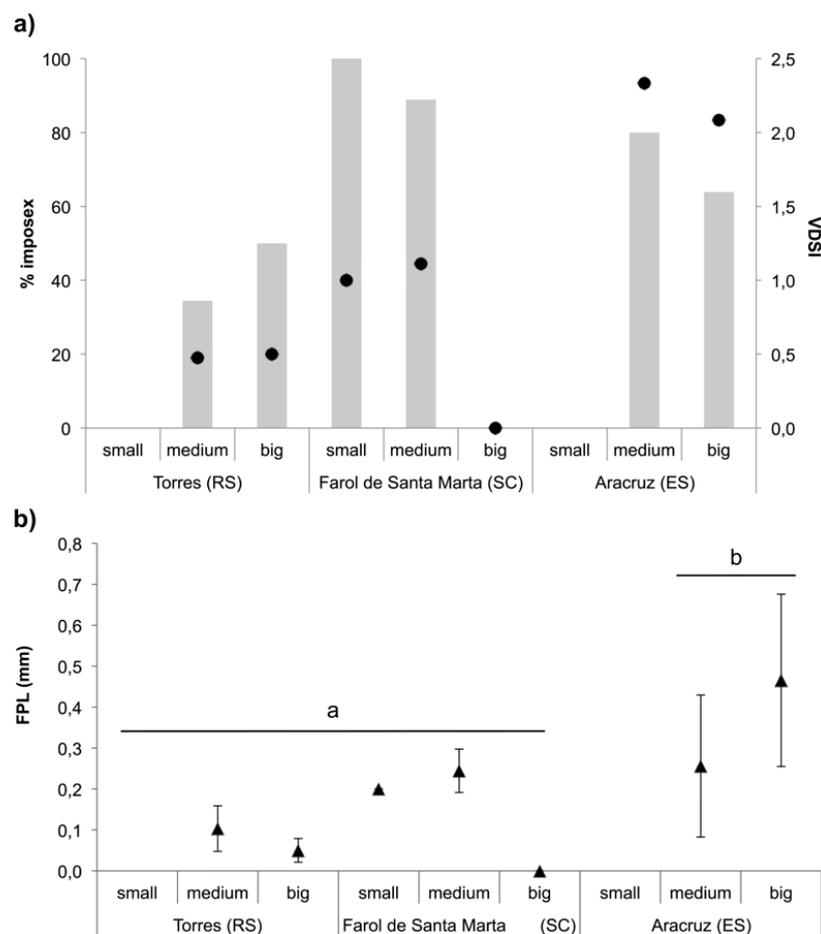


Figura 5.2-6 – *Stramonita brasiliensis*. Results obtained for *Stramonita brasiliensis* snails from Torres (RS), Farol de Santa Marta (SC), and Aracruz (ES), with different sizes exposed to tributyltin (TBT) by injections of  $0.5 \mu\text{g TBT g}^{-1}$ , in experiments performed during summer. a) % imposex (gray bars, left axis) and vas deferens size index (VDSI; circles, right axis); b) female penis length (FPL; mm, triangles). There were no snails in the Torres (RS) and Aracruz (ES) experiments. (a, b) denote statistically significant differences ( $p < 0.0001$ ) between location of origin.

## Discussion

The results obtained from the experiments showed that TBT exposure led to a decrease in the Condition and Gonadosomatic indices following imposex induction in *Stramonita brasiliensis*. However, in addition to the negative effects of TBT exposure, we observed marked differences in the sensitivity of the snails. The authors of a recent study reported a lethal dose (LD50) of 6.2  $\mu\text{g TBT g}^{-1}$  for another muricidae species (*Trophon geversianus*) (Primost *et al.*, 2015), confirming the high resistance of gastropods to acute TBT exposure. Although injection is a non-environmental exposure technique, the method has been used in other studies (Bryan *et al.*, 1988; Horiguchi *et al.*, 1995, 1994; Santos *et al.*, 2006), and adequately demonstrates the effects of the parameters tested.

A total of 202 female snails were injected with 0.5  $\mu\text{g TBT g}^{-1}$ . We assumed that the tissues of the gastropods assimilated TBT in an amount equivalent to the TBT dose injected. After 30 days, 54% of the exposed females had developed imposex. The imposex parameters observed after the experiments suggested that the season and the size of the snails might influence imposex development in *S. brasiliensis*. Furthermore, we proved that susceptibility to imposex induction by TBT varied among the different populations of this species.

Gibbs *et al.* (1997) had predicted the discovery of species apparently lacking the imposex response or with differential sensitivity to TBT exposure. There are reports in the literature of a few gastropod species that have been exposed to TBT under laboratory conditions to investigate imposex development (Tabela 5.2-1). Results presented in the literature are from laboratory experiments conducted over a wide range of concentrations/doses and times of exposure, which makes it difficult to compare sensitivity between species.

Tabela 5.2-1 – Previous laboratory studies investigating the development of imposex.

Species	% imposex	[ exposure concentration/dose]	Duration	Author
---------	-----------	--------------------------------	----------	--------

<i>Hexaplex trunculus</i>	12–100	5 ng TBT L <sup>-1</sup>	5 months	(Abidli <i>et al.</i> , 2009)
	12–100	50 ng TBT L <sup>-1</sup>		
<i>Nucella lapillus</i>	20–50	50 ng TBT L <sup>-1</sup>	3 months	(Santos <i>et al.</i> , 2005)
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	2.5–27	1 ng TBT L <sup>-1</sup>	6 months	(Gooding <i>et al.</i> , 2003)
	2.5–28	10 ng TBT L <sup>-1</sup>		
<i>Buccinum undatum</i> (juvenile)	54	100 ng TBT L <sup>-1</sup>	11 months	(Mensink <i>et al.</i> , 1996)
<i>Buccinum undatum</i> (adult)	0	1 µg TBT L <sup>-1</sup>	11 months	(Mensink <i>et al.</i> , 2002)
<i>Stramonita brasiliensis</i>	33	40 ng TBT animal <sup>-1</sup>	28 days	(Limaverde <i>et al.</i> , 2007)
	53	82 ng TBT animal <sup>-1</sup>		
	80	165 ng TBT animal <sup>-1</sup>		
<i>Stramonita brasiliensis</i>	17	10 ng TBT L <sup>-1</sup>	6 months	(Rossato, 2011)
	85	370 ng TBT L <sup>-1</sup>		
	100	1370 ng TBT L <sup>-1</sup>		
<i>Stramonita brasiliensis</i>	54	5000 ng TBT g <sup>-1</sup>	1 month	Present work

Susceptibility to imposex induction by TBT varies among species and appears to be related to reproductive maturation. The mollusk endocrine system that is responsible for reproduction is highly dependent on the interaction between hormones. The reproductive stages of muricid gastropods are dictated by season, and in general, reproduction takes place in summer. Our previous studies have shown that *S. brasiliensis* snails from South Brazil have annual variability in their reproductive cycle, with a reproductive period in summer and a non-reproductive period in winter (unpublished data). Based on the results obtained from the winter and summer experiments, it was clear that females from Farol de Santa Marta (SC) in the reproductive phase developed imposex to a greater extent than those in the non-reproductive phase. McClellan-Green *et al.* (2007) reported that susceptibility to imposex induction varies among species and appears to be related to reproductive maturation. However, the results obtained in the current for *S. brasiliensis* contradicted those reported by the authors of previous studies using *Nucella lapillus* from the northern hemisphere (Bryan *et al.*, 1987; Gibbs *et al.*, 1997; Matthiessen & Gibbs, 1998; Quintela *et al.*, 2000), in which females developed imposex to a greater extent during the non-reproductive period. The results for *S. brasiliensis*

could to indicate the role of RXR signaling in imposex development in this species, because TBT may induce the development of imposex by initiating RXR signaling prematurely in females only when exposure occurs during the temporal window of female recrudescence (Sternberg *et al.*, 2010), but that will not be discussed here.

There was greater sensitivity in small (%I = 80, FPL = 0.20 mm, and VDSI = 0.83) and medium (%I = 59, FPL = 0.24 mm, and VDSI = 0.67) *S. brasiliensis* snails from Farol de Santa Marta (SC) exposed during summer and winter, whereas big snails had very low imposex levels (%I = 11, FPL = 0 mm, and VDSI = 0.11). McClellan-Green *et al.* (2007) reported the same findings for *N. lapillus*.

In a study on *Thais distinguenda* translocated to an area of intense shipping activity, Bech *et al.* (2002) found that smaller snails (< 25 mm) developed imposex faster than large snails (> 25 mm shell length), but there was no significant difference in the sensitivity of the two size classes after 5 months. Experiments on *N. lapillus* showed that juveniles were more sensitive to TBT than adults (Bryan *et al.*, 1987; Matthiessen & Gibbs, 1998; Quintela *et al.*, 2000). Gibbs & Bryan (1996) suggested that the development of imposex in *N. lapillus* was mainly determined during the first 2 years of life, although development could be subsequently advanced with increased exposure in the medium stage. The authors of studies on *N. lapillus*, *Buccinum undatum*, and *Hinia reticulata* attribute the pronounced imposex in juveniles to the absence of a complete reproductive system at that stage of life (Mensink *et al.*, 2002; Stroben, 1994). In those studies, imposex induction by TBT in adults and senile snails was reported only when the exposure was at high TBT concentrations. For *S. brasiliensis*, our results indicate that there are differences in imposex levels when snails of different sizes are exposed to TBT. Small and medium females were significantly more sensitive than big females. This is in accordance with the results reported by Vasconcelos *et al.* (2006) that the sensitivity of *Hexaplex trunculus* from Ria Formosa, Portugal decreased with increasing shell length. The authors suggested that this may have been due to the higher metabolic rate in small snails (with a consequently higher accumulation of TBT), or to acclimation of the snails during continuous and

prolonged exposure to the pollutant (with subsequent attenuation of sensitivity to the effects of imposex).

In contrast to the findings reported by Mensink *et al.* (1996) that big specimens of *B. undatum* do not develop imposex when exposed in the laboratory, in the present study, the bigger specimens (i.e., senile) were susceptible to imposex, although to a lesser extent than the small and medium specimens. This indicates the higher sensitivity of older *S. brasiliensis* females in comparison with other species. Variability of imposex susceptibility with specimen size should be considered in TBT biomonitoring because it is unknown in the majority of gastropod species.

A recent study suggests that seasonal differences in bioaccumulation should be considered when using gastropods for TBT biomonitoring, i.e., taking into account the latitude, the specific growth, the reproductive season, and the habitat in which the snails occur (Harding *et al.*, 2016). Wang *et al.* (2014) suggested that the differences between sensitivity to chemicals among species from temperate and tropical regions are relatively small, and temperate species are more sensitive to TBT. However, this was not reflected in our results. The females from Aracruz (ES) (latitude 19°; tropical area) were much more sensitive than the females from Farol de Santa Marta (SC) (latitude 27°; temperate area) and Torres (RS) (latitude 29°; temperate area). We attribute this variation in imposex responses between populations to physiological differences due to differences in living conditions. The Aracruz (ES) population lives in conditions of extreme heat all year, whereas the Farol de Santa Marta (SC) and Torres (RS) populations live in regions of variable climate, with clearly distinct summer and winter seasons. The reproductive cycle of the Aracruz population is unknown, but high temperature could lead to reproductive behavior throughout the year. Consequently, we speculate that this reproductive behavior promotes imposex induction, because imposex is more prevalent during reproductive periods.

All the factors tested (season, size, and origin) had a significant influence on imposex development. It is very important to take into these factors when gastropods are used in biomonitoring TBT pollution. In the case of size, some approaches have already been used to minimize bias, such as normalizing indices by the size of the snails (see Castro & Fillmann (2012); Gravel *et al.*

(2006); Grimón *et al.* (2016)). In the case of seasonality, the solution is simultaneous monitoring (collection of all snails at the same time of year). However, no tools are available to remove or minimize the influence of different sources. Thus, spatial and temporal assessments of imposex (which is increasingly prevalent, despite the ban on the use of TBT) should take into account these factors, and perhaps it is better to avoid direct comparisons between organisms of the same species obtained from different locations.

TBT compounds are priority hazardous substances, and are cited in European Water Framework Directives (WFDs) 2000/60/EC and 2008/105/EC. The requirements set by the WFDs for TBT are quite difficult to quantify by chemical analysis without the use of expensive and high-performance methods. A scheme for assessing imposex and chemical measurements has been described by OSPAR (JAMP, 2016) and Strand *et al.* (2006), and it links the assessment of the relationship between imposex and the concentration of TBT in water, mussels, and sediment (Nyberg *et al.*, 2013). However, it is very important to emphasize that the existing European national regulations do not consider the effects investigated in the present study. Moreover, as explained above, similar variation in imposex development caused by TBT exposure can be seen in other species, including those most widely used in TBT biomonitoring globally (*N. lapillus*, *Ilyanassa obsoleta*, *B. undatum*, and *H. trunculus*).

## Conclusions

Season, size, and origin may produce confusing effects on imposex assessments. As discussed before, although the use of imposex in TBT biomonitoring has been widespread in recent studies, including the present one, the responses of exposed organisms can vary according to the reproductive stage of the females during exposure or the size of the females. Furthermore, biomonitoring covering large areas, such as the Brazilian coast, can eventually give rise to bias caused by differences in subject sensitivity. This difference may be caused by the genetic isolation of populations, or by differences in the reproductive cycle caused by climatic differences.

The *S. brasiliensis* population from the southeast (tropical) region was more sensitive than the population from the south (temperate) region of Brazil.

Regarding size, we found greater sensitivity in small and medium snails (with a shell length of up to 40 mm). Imposex was also more prevalent when females were exposed during their reproductive period, which occurs in summer in the southern population.

Therefore, the use of imposex as a biomarker of TBT pollution must take into account certain intrinsic factors in order to avoid the introduction of bias in the interpretation of results originating from imposex levels.

### **Acknowledgments**

M. Rossato is a PhD candidate at Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (PPGOFQG) sponsored by CAPES. This research was supported by FINEP (Project 672-PO-14-AIBRASIL). I.B. Castro was sponsored by CNPq (PQ 306486/2015-6). We thank Dr. Gilberto Fillmann (CONECO) for laboratory support and Marcella Bueno Ribeiro for her assistance in Aracruz' experiment.

### 5.3. “Elucidating the toxicokinetics of TBT in a gastropod species by whole body autoradiography and *in vivo* gamma counting”

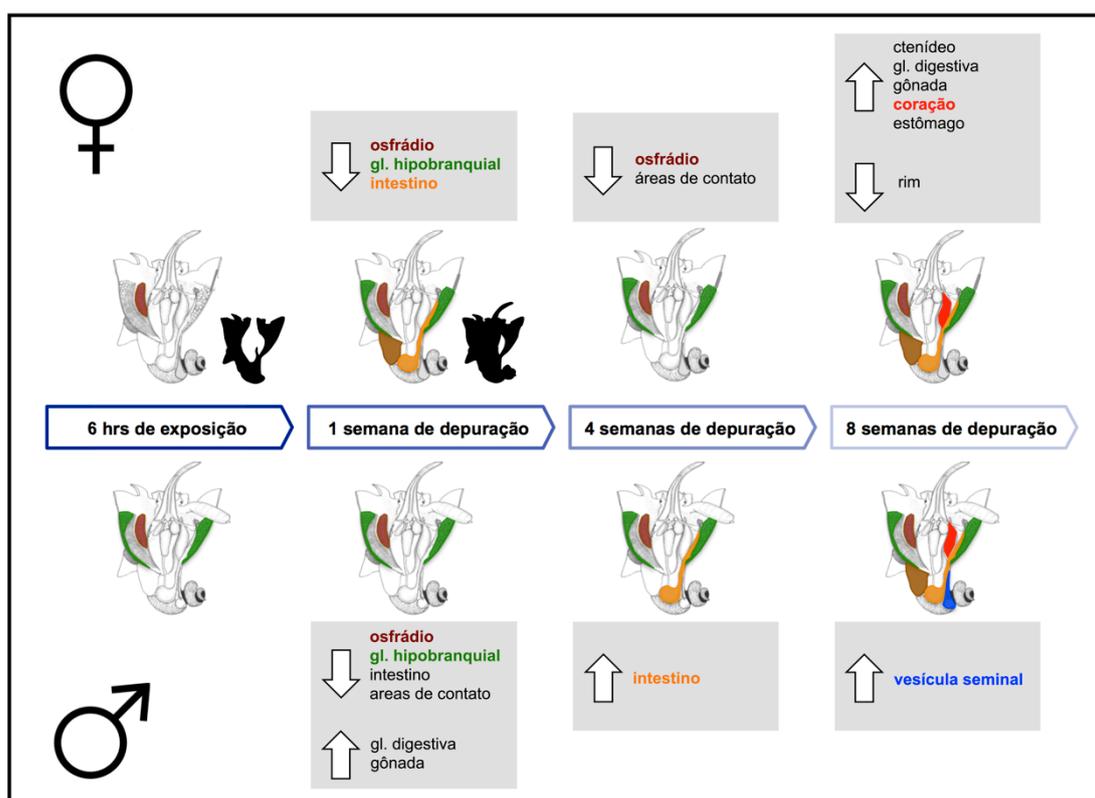
Rossato, M.; Rouleau, C.; Pinho, G. L. L.

#### Abstract

When tributyltin (TBT) is released into the environment, it tends to be rapidly adsorbed to particulate matter and dissolved organic matter or absorbed by organisms. Therefore, the objective of this work was to elucidate the toxicokinetics of TBT in the body of the gastropod *Buccinum undatum*, after exposure through water contaminated with radioactive  $^{113}\text{Sn}$ -TBT. *B. undatum* specimens of both sexes were collected from the Gulf of St. Lawrence (Quebec, Canada) and were acclimated in laboratory. Uptake and elimination kinetics were determined by *in vivo* gamma counting and fine-scale tissue distribution was visualized by whole-body autoradiography in order to know the fate of TBT in a model gastropod. BCF value found for TBT in present study was the biggest of related in gastropods and considered highly bioaccumulative. It was clearly observed through kinetic parameters and autoradiographic images that TBT is fastly absorbed from the aquatic environment, by osphradium and hypobranchial gland, which were considered the fast-elimination compartment because in 1 depuration week reduced about 50% of radioactivity levels. Females did not accumulated TBT in their reproductive organs and it is worth mentioning that all soft tissue of *B. undatum* should be used in organotins tissues quantification, to avoid sub estimation about the environmental contamination. Furthermore, females presented capacity to eliminate TBT in tissues in 46 days. Then, when TBT is found in the tissues is evidence that females were exposed to recent TBT inputs from the environment. In addition to knowledge about TBT distribution and toxicocinetics, results here presented add important information to improve the organotins biomonitoring studies.

**Keywords:** autoradiography, bioaccumulation, *Buccinum undatum*, tributyltin.

## Graphical abstract



## Introduction

Tributyltin (TBT) has been widely used in antifouling paints for fishing boats, large ships, harbor structures, marine platforms and aquaculture nets (Abidli *et al.*, 2012). Although very effective against biofouling, TBT also prove to be highly toxic for non-target species (Furdek *et al.*, 2016) such as bivalves, fish, and marine mammals, by causing DNA damage (genotoxicity) and changes in shell structure, larval development, and growth (Alzieu, 1998; Axiak *et al.*, 1995; Jha *et al.*, 2000a, 2000b; Micael *et al.*, 2007; Tiano *et al.*, 2001).

Among affected organisms, stand out mollusks gastropods. Female gastropods develop imposex (Smith, 1971). Imposex is the imposition of male reproductive organs (penis and vas deferens) on female gastropods. This masculinization is due endocrine disruption by TBT and can occur in female gastropods exposed to seawater containing as low as a few nanograms Sn per liter (Abidli *et al.*, 2012, 2009; Gibbs & Bryan, 1986).

This phenomenon is currently considered the best-documented example of endocrine disruption in wildlife (Matthiessen & Gibbs, 1998) and has been

reported to occur in more than 260 species of prosobranch gastropods (Sternberg *et al.*, 2010; Tittley-O'Neal *et al.*, 2011). Because its effects, actually TBT is considered one of the most toxic substance ever introduced deliberately by man into the environment (Alzieu *et al.*, 1991).

As the high toxicity, the use of TBT in anti-fouling paints has been banned worldwide in 2008 (Champ, 2000). But, remarkably, there has been a report that TBT-based antifouling paints are still offered for sale (Turner & Glegg, 2014). More importantly, high levels of TBT and its metabolites, dibutyl and monobutyltin, are still found in water or in bottom sediments from commercial and fishing harbors and marinas in Spain (Díez *et al.*, 2002), in France (Cassi *et al.*, 2008; Michel & Averty, 1999), in Poland (Filipkowska *et al.*, 2014), Croatia (Furdek *et al.*, 2012), Chile (Batista *et al.*, 2016) and Argentina (Delucchi *et al.*, 2007). In the environment, TBT tend to adsorb in settling suspended particulate material (Antizar-Ladislao, 2008), however, the adsorption of TBT to sediments is reversible, and natural processes as well as human activities can make the TBT bioavailable again for organisms (Berto *et al.*, 2007; Fent, 2004).

As these substances accumulate in animals, TBT has also been shown to interfere with the activity of P450 enzymes (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2007; Padrós *et al.*, 2000, 2003). P450 mediated activity and expression are found in various tissues and organs of marine invertebrates and depending on the biological function, P450s can be very selectively expressed in specific tissues or, though at different levels, in various tissues and they regulation may play a central role in the adaptation of animals to environmental pollutants (Rewitz *et al.*, 2006). In gastropods, P450 enzymes would be responsible by TBT dealkylation into DBT and MBT degradation products (Pellizzato *et al.*, 2004).

TBT bioconcentration from water is influenced by a number of abiotic and biotic factors including exposure time, physic-chemical form of the pollutant, salinity, temperature, and competitive effects with other substances, stage of the life cycle, physiology and feeding strategy of the organism (Axiak *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2002a, 2002b). Considering the multitude of factors influencing the bioaccumulation process, it is not surprising that, for TBT, bioconcentration factors (BCF) vary across a wide range, even among the same

class of organisms, i.e  $5,1 \times 10^3$  –  $1,68 \times 10^4$  to gastropods (Bauer *et al.*, 1995; Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995).

As such, there is the possibility of difference between male and female specimens in the accumulation, elimination and biotransformation rates of toxic substances. Previous studies reported that the metabolic capacity of TBT in the gastropod *Thais clavigera* is markedly stimulated after exposure to high TBT concentrations and that females accumulate TBT in their reproductive organs, at the same time that males exhibit more effective elimination mechanisms compared to females (Wang *et al.*, 2010). However, in *Nassarius nitidus* and *Nassarius reticulatus*, did not founded any significant differences in the bioaccumulation of organotins between genders (Cacciatore *et al.*, 2016b; Couceiro *et al.*, 2009).

For gastropods, laboratory experiments of TBT bioaccumulation evaluation are scarce on the literature (Bauer *et al.*, 1997; Bryan *et al.*, 1987; Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995; Stroben *et al.*, 1992). These studies realized organs dissection to available TBT distribution.

Whole-body autoradiography (WBARG) allows visualizing the distribution of a radiolabeled chemical in thin cryosections of a whole animal (Ullberg *et al.*, 1982). Although WBARG does not allow discerning parental compounds from its metabolites, it provides very consistent quantitative tissue distribution data (Solon *et al.*, 2002) that may reveal unexpected sites of accumulation. Opposite to traditional dissection methods, the advantage of WBARG is minimal sample processing/alteration and provision of true tissue-level (as opposed to organ-level) concentrations from *in situ* preparation, beyond the sensitivity, unmatched even by LSC technology (Solon, 2015).

There are only two works (Bryan *et al.*, 1993, 1989) that used the whole-body autoradiography (WBARG) in gastropods as a tool to explain the uptake, distribution and breakdown of  $^{14}\text{C}$ -labelled TBT at tissues and cellular levels of dog whelk *Nucella lapillus* exposed via water, diet of labeled mussels and by injection. The problem with  $^{14}\text{C}$ -labelled TBT is that is impossible to distinct between TBT, DBT and MBT, and radiolabelled  $^{14}\text{C}$ -butyl group resulting from the metabolisation of TBT. Due to this, in the present work has used  $^{113}\text{Sn}$ -TBT.

The whelk *Buccinum undatum* is a mollusk gastropod common in the subtidal waters of the North Atlantic shelf waters (de Vooy & van der Meer,

2010). It was selected due to its importance in aquatic ecosystem. The species is predator, carnivorous and principally, because it is considered an important artisanal whelk fishery, being widely consumed by the human population.

By its characteristics and because its sensitivity, *B. undatum* is quite used as a bioindicator of TBT contamination (Strand & Jacobsen, 2002). Information about detailed tissue distribution of TBT can contribute to elucidation the bioaccumulation behavior and even about mechanism of imposex induction. The present study shows the bioaccumulation and tissue distribution of  $^{113}\text{Sn}$ -TBT in males and females of common whelk *B. undatum* upon a 6 h exposure via water, followed by depuration time (53 days). Uptake and elimination kinetics were determined by *in vivo* gamma counting and fine-scale tissue distribution was visualized by whole-body autoradiography in order to know the fate of TBT in a model gastropod.

## Materials and methods

### Organisms, radiotracer and experimental procedure

Tributyl[ $^{113}\text{Sn}$ ]tin chloride ( $^{113}\text{Sn}$ -TBT) solution in hexane was prepared from inorganic  $^{113}\text{Sn}$ (IV) (Polatom, Otwock, Poland; specific activity 90.9 MBq mg Sn) according to Rouleau (1998). Purity of  $^{113}\text{Sn}$ -TBT obtained was > 99%, as assessed by thin layer chromatography (Figura 5.3-1).

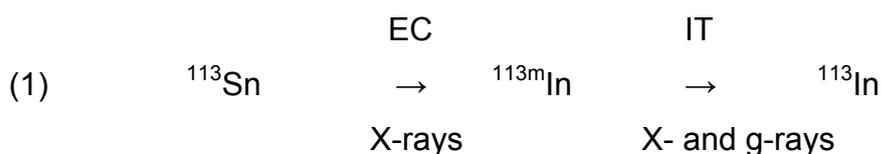
Common whelks (shell length  $8.8 \pm 0.9$  cm, total weight  $80.3 \pm 21.2$  g) were harvested in the Southwestern Gulf of St. Lawrence (Quebec, Canada). Before the experiment, the animals were acclimated for 1 week in a 300 L aquarium provided with running seawater ( $10 \text{ L min}^{-1}$ ). Water temperature was  $7.9 - 8.8^\circ\text{C}$  and salinity 23 - 27 throughout acclimation and experimental periods. The light/dark cycle was 12/12 and animals were fed three times a week with fish carcasses.

For exposure, groups of 7 whelks were placed in two glass aquariums containing 30 L of aerated and  $0.45 \mu\text{m}$  filtered seawater, and spiked with radioactive TBT 30 min before adding whelks. Nominal  $^{113}\text{Sn}$ -TBT concentration was  $10 \text{ kBq } ^{113}\text{Sn-TBT L}^{-1}$ , which represent  $110 \text{ ng TBT (as Sn) L}^{-1}$ . Real concentration measured at  $t = 0$  on both aquariums were  $8.7$  and  $9.3 \text{ kBq L}^{-1}$  ( $99$  and  $106 \text{ ng TBT (as Sn) L}^{-1}$ ). After exposure period (6 h), all whelks were

then transferred to a 300 L tank with running seawater, as described above, and allowed to depurate for 8 weeks. A pair of whelks (1 female and 1 male identified by the penis) was sampled at the end of the exposure period and after one, four, and eight weeks of depuration and used for WBARG (see below).

### Radioactivity measurements

The disintegration of  $^{113}\text{Sn}$  is a two-step phenomenon (Eq. 1). First,  $^{113}\text{Sn}$  disintegrates by electron capture (EC, half-life 115.09 d) to  $^{113\text{m}}\text{In}$ , which in turn transform into stable  $^{113}\text{In}$  by internal transition (IT, half-life 1.658 h).



Disintegration of both  $^{113}\text{Sn}$  and  $^{113\text{m}}\text{In}$  result in X-rays emission (24-27 keV), but the 392-keV g-ray used to quantify  $^{113}\text{Sn}$  is emitted by  $^{113\text{m}}\text{In}$ . This is not a problem as long as both isotopes are at secular equilibrium. However, any chemical process that will separate  $^{113}\text{Sn}$ -TBT from  $^{113\text{m}}\text{In}$  species will result in the underestimation of a sample activity based on the 392-keV g-ray peak (Rouleau, 1998). An example of such a separation was illustrated by autoradiograms of the TLC plate used to determine the purity of  $^{113}\text{Sn}$ -TBT in hexane (Figura 5.3-1). Immediately after elution, a spot of radioactivity is seen at point of origin, along with a trail between the point of origin and the actual  $^{113}\text{Sn}$ -TBT spot. These features result from  $^{113\text{m}}\text{In}$  present in the sample tested and produced during the elution, which was in a chemical form unable to migrate in the TLC plate. Once time is allowed the re-establishment of secular equilibrium ( $\geq 8$  h), only a single spot remains (Figura 5.3-1).

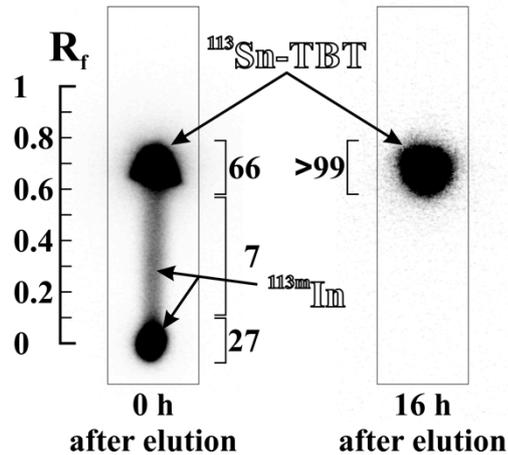


Figura 5.3-1 – Autoradiograms of thin-layer chromatograms.

To avoid any problem related to the disruption of secular equilibrium, 5-mL of water samples collected during this experiment were left to stand overnight before measurement. Radioactivity was then quantified by Wizard 1480 (Wallac) gamma counter (10 min counting time, 15-450 keV counting window, 42% detection efficiency, detection limit 0.2 Bq in sample) and corrected for background and decay. Triplicate samples were collected at  $t = 0$ , 1.5, 3, 4.5 and 6 h during exposure. During the depuration period, water samples were collected twice a day on the first and second days of depuration and daily until the end of experiment.

Radioactivity in whelks was measured *in vivo*, using a cylindrical NaI(Tl) gamma detector 76 mm in diameter inserted in a 2-cm thick cylindrical lead shield. Both X-rays (24-27 keV) and g-ray at 392 keV were quantified. The performance and stability of the gamma counter was assessed with standards prepared from six empty whelk shells stuffed with paper towels uniformly spiked with  $^{113}\text{Sn-TBT}$  (Tabela 5.3-1). Activity in standards was measured before every counting session whereas background was measured for 10 min before, during and after each counting session.  $^{113}\text{Sn}$  activity in whelks was measured *in vivo* 4 times during the 6 h exposure period, twice a day during the first and second days of depuration, and 5 times a week until the end of experiment, as previously described. Briefly, each whelk was removed from aquarium, wiped, put in a plastic dish, and precisely positioned below the gamma detector.  $^{113}\text{Sn}$  activity, in counts per min (CPM) was measured for 1 to 2 min (random counting error <5%). CPM data were corrected for background and decay. Conversion to

Bq of  $^{113}\text{Sn}$  was done with the overall average detection efficiency measured for g-ray ( $4.80 \pm 0.31\%$ , table Tabela 5.3-1). X-ray over g-ray count ratio was also computed, as a constant value ascertain that  $^{113}\text{Sn}$  and  $^{113\text{m}}\text{In}$  are at secular equilibrium (Rouleau *et al* 1998). Soft tissues weight was recorded when whelks were either sampled for WBARG or at the end of the 8-w depuration period, and used to calculate  $^{113}\text{Sn}$  concentration (Bq kg soft tissues).

Tabela 5.3-1 – *Buccinum undatum*. Measurement efficiency (e, in %, mean  $\pm$  SD, n = 28) for X-rays (24-27 keV) and g-ray (392 keV) in whelk standards. The ratio of X-rays and g-ray counts measured is also shown.

	$^{113}\text{Sn}$ (kBq)	Shell height (cm)	Detection efficiency (%) <sup>a</sup>		X-rays / g-ray Count ratio
			X-rays	g-ray	
Standard 1	7.1	9.1	$1.33 \pm 0.06$	$4.74 \pm 0.20$	$0.52 \pm 0.02$
Standard 2	7.1	8.6	$1.71 \pm 0.09$	$5.25 \pm 0.21$	$0.60 \pm 0.03$
Standard 3	14.3	9.7	$1.42 \pm 0.05$	$4.98 \pm 0.10$	$0.53 \pm 0.02$
Standard 4	14.3	8.9	$1.27 \pm 0.09$	$4.83 \pm 0.18$	$0.48 \pm 0.02$
Standard 5	28.5	8.7	$1.25 \pm 0.04$	$4.47 \pm 0.09$	$0.52 \pm 0.01$
Standard 6	28.5	8.8	$1.09 \pm 0.04$	$4.51 \pm 0.09$	$0.45 \pm 0.01$
All		$9.0 \pm 0.4$	$1.34 \pm 0.21$	$4.80 \pm 0.31$	$0.52 \pm 0.05$

<sup>a</sup> Based on emission intensity of 120.2% for X-rays (24-27 keV) and 64.9% for 392-keV g-ray, for  $^{113}\text{Sn}$ - $^{113\text{m}}\text{In}$  system at secular equilibrium (Decay Radiation Search, [http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/indx\\_dec.jsp](http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/indx_dec.jsp))

### Whole Body Autoradiography (WBARG)

Soft tissues were detached from the shell, embedded in a 2.5% (p/v) aqueous gel of carboxymethylcellulose, and flash-frozen in liquid nitrogen. From the resulting block, 10 to 15 pairs of 50-mm-thick sections were cut at different levels with a specially designed cryomicrotome (Leica CM3600), at  $-25^\circ\text{C}$ , allowing to sample all organs, tissues and fluids. Tissue sections were freeze-dried for 32 h and then exposed one week on phosphor screens. The screens were scanned with a Cyclone Phosphor Imager (Perkin-Elmer) to obtain images of  $^{113}\text{Sn}$  tissue distribution.

Three to five whole-body tissue sections were analyzed from each animal. Areas of interest were isolated and radioactivity quantified with the software Optiquant 4.0 (Perkin-Elmer). Radioactivity concentrations in tissues were expressed as Digital Light Unit per  $\text{mm}^2$  of tissue section and per hour of

exposure time (DLU mm<sup>-2</sup> h), after correction of raw data for background, exposure time on phosphor screens, and <sup>113</sup>Sn decay.

### **Kinetic models of accumulation and elimination**

Uptake rate constant  $k_u$  was calculated following the method of Børretzen & Salbu (2009). The equation that better represent the uptake is a simple first order rate equation in which the rate of accumulation in the animal [ $dC_A / dt$ ] is related to the concentration in water,  $C_W$ , and an uptake rate constant  $k_{upt}$ .

$$[dC_A/dt] = k_u \cdot C_W$$

In a closed system,  $C_W$  decreased as contaminant accumulation proceeded. In this case, integration of equation as a function of  $t$  gives

$$C_A = k_u \int C_W dt$$

where  $C_A$ , the <sup>113</sup>Sn concentration in the animal at time  $t$ , is in Bq g wet weight (ww). A plot of  $C_A$  as a function of  $\int C_W dt$ , the area under the curve of a plot of  $C_W$  vs  $t$  estimated with the trapezoidal rule and having units of Bq h mL, yields a straight line of slope  $k_u$  (mL exposure water h g<sub>ww</sub>).

Elimination was modeled with the following bi-exponential equation:

$$C_t = [C_1 \cdot e^{(-k_{e1} \cdot t)}] + [C_2 \cdot e^{(-k_{e2} \cdot t)}]$$

where  $C_t$  is expressed as a percentage of radioactivity remaining at time  $t$  relative to the radioactivity measured at  $t_0$ ;  $C_1$  and  $C_2$  represent the percentage of radioactivity in the fast ( $C_1$ ) and slow ( $C_2$ ) kinetic compartments at  $t_0$  ( $C_1 + C_2 = C_{t0} = 100$ ), whereas  $k_{e1}$  and  $k_{e2}$  are their respective elimination rate constants (d). Values of  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $k_{e1}$ , and  $k_{e2}$  were determined by nonlinear regression analysis of plots of  $C_t$  as a function of  $t$  with the software LabFit<sup>®</sup> (Wilton P. da Silva, Federal University of Campina Grande, Brazil, <http://zeus.df.ufcg.edu.br/labfit/>).

Long-term bioaccumulation factor was modeled with the following generic model:

$$BCF_t = [BCF_1 \cdot (1 - e^{(-k_{e1} \cdot t)})] + [BCF_2 \cdot (1 - e^{(-k_{e2} \cdot t)})]$$

$BCF_t$  is the quantity of Sn in scallop at time  $t$  expressed as a bioconcentration factor (in mL exposure water  $g_{ww}$ ).  $BCF_1$  and  $BCF_2$  are the steady-state bioconcentration factors for  $t = \infty$  characterizing compartments 1 and 2, which equal  $(C_1 \cdot k_u / k_{e1})$  and  $(C_2 \cdot k_u / k_{e2})$ , respectively (Metian *et al.*, 2008).

### Statistical analysis

In whole body autoradiography, tissues and organs were compared between themselves and between times of experiment by ANOVA followed by a Tukey test (post hoc). Males and females were compared by t-test. When the assumptions were not achieved, data were log-transformed or the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. Analyses were realized in RStudio.

### Results

After 6 hours of exposure, 40% of the radioactive  $^{113}\text{Sn}$ -TBT added to the tanks was absorbed by the gastropods, whereas 67 - 70% of  $^{113}\text{Sn}$ -TBT accumulated was depurated during the depuration time (53 days).

The kinetics and estimated parameters are shown in Figura 5.3-2.  $k_{upt}$  values ranged between 20.3 and 177.7  $\text{mL g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . The whole-body uptake kinetics of  $^{113}\text{Sn}$ -TBT from seawater in males and females of *Buccinum undatum* are shown in Figura 5.3-2a. They were described by linear equations ( $R^2 > 0.99$ ).

The depuration time appears divided into two stages, fast eliminating and slow eliminating and was better explained by a bi-exponential equation ( $R^2 = 0.97$  and  $0.94$  for females and males, respectively - Figura 5.3-2b). Both the fast and slow-compartment contributed to approximately 50% of depuration kinetic in males and females, but the biological half-life was short in the fast-compartment ( $2.7 \pm 0.5$  for males and  $3.2 \pm 0.2$  days for females). In the slow-

compartment, TBT was strongly retained ( $47 \pm 7$  and  $55 \pm 1$  days, for females and males, respectively) (Figura 5.3-2b).

50% of  $^{113}\text{Sn}$ -TBT was eliminated from the body of whelks in approximately 18 days. Although the steady state was not reached during the time course of the experiment, values of BCF increase rapidly during the first 10 days of depuration, and much slower until a steady state to be reached at day 55 and 70 for females and males, respectively (Figura 5.3-3).

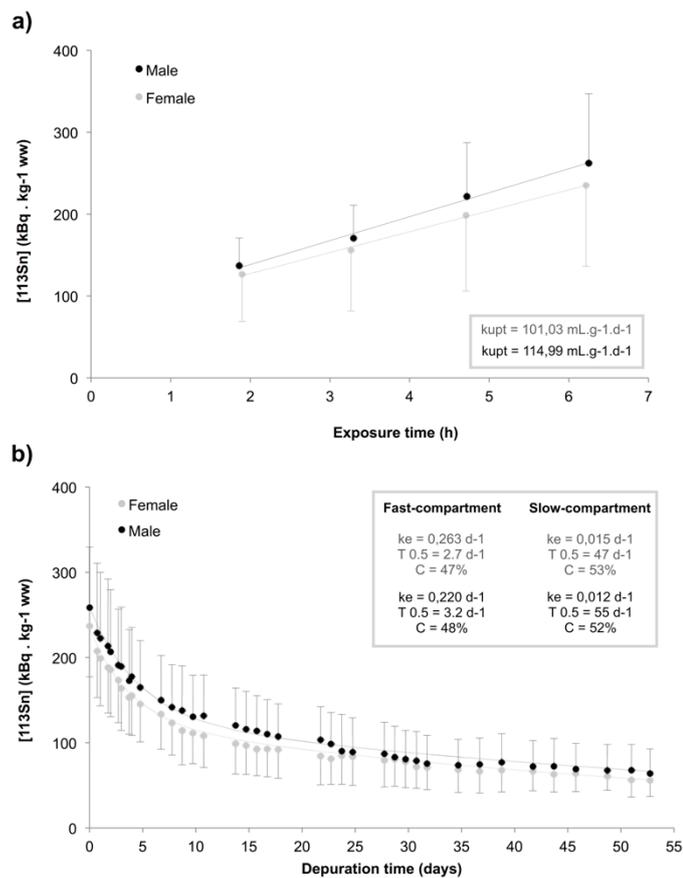


Figura 5.3-2 – *Buccinum undatum*. a)  $^{113}\text{Sn}$ -TBT concentration in tissues by time during 6 hours of exposure; b)  $^{113}\text{Sn}$ -TBT depuration in tissues by time during 53 days of elimination.

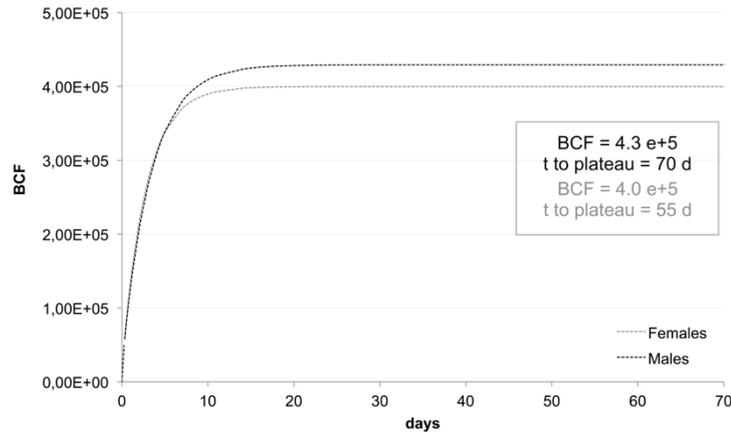


Figura 5.3-3 – *Buccinum undatum*. Long term average bioaccumulation of  $^{113}\text{Sn-TBT}$ .

The distribution of  $^{113}\text{Sn-TBT}$  and the levels of radioactivity revealed by autoradiography are shown in Figura 5.3-4 and Figura 5.3-5. After 6 hours of exposure, was clear to see that uptake of  $^{113}\text{Sn-TBT}$  occurred predominantly in osphradium in females and hypobranchial gland and osphradium in males. At end of exposure, males' presented significantly higher radioactivity levels than females in contact areas and hypobranchial gland. In females, were not detected radioactivity in digestive gland, digestive tract, gonad and heart.

After 1 week of depuration, females heart still not presented radioactivity and distribution in tissues was similar between males and females. In females, osphradium and hypobranchial gland, intestine and kidney presented the higher levels, despite the bigger reduction in radioactivity levels had happened at this time. Males presented this same reduction, however, it is important to highlight the enlargement in digestive gland and gonad.

After 4 week, the radioactivity distribution observed was similar to 1 week. Males present higher levels than females in contact area, ctenidium, hypobranchial gland and osphradium. Females presented a decrease in contact area and osphradium radioactivity, while males improve levels in osphradium and intestine.

After 8 weeks of depuration, osphradium still has significant higher radioactivity, followed by hypobranchial gland and intestine, perhaps, heart,

kidney and intestine presented high levels in both sexes. Males improve radioactivity levels in seminal tubules.

Osphradium is located in the top of mantle cavity, where the water passes to the respiratory organs. In the sections of WBARG, osphradium appear alone or together with a few organs, and because this, this organ do not appear in the optical images presented here in Figura 5.3-4. No animals died or showed any signs of stress during the experiment.

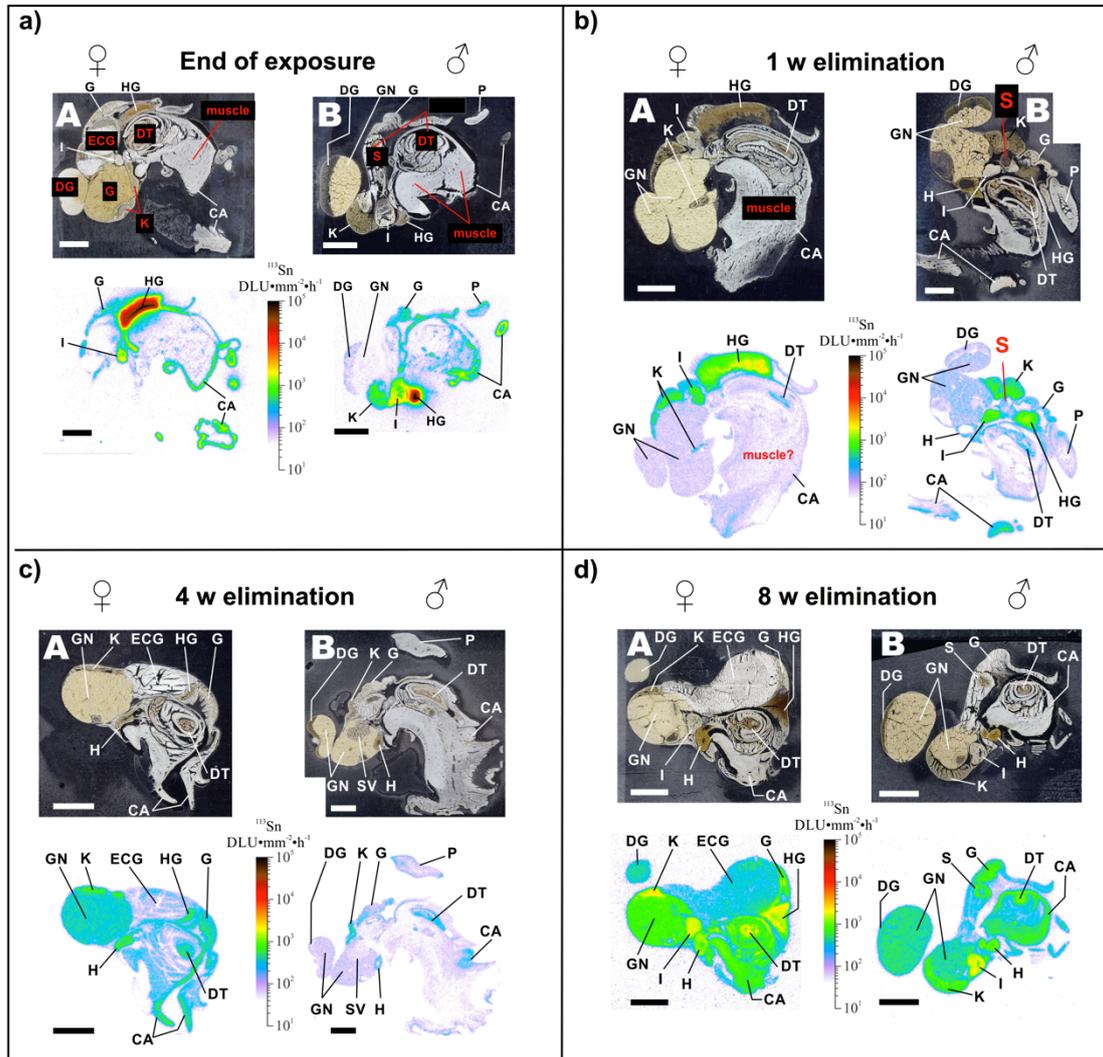


Figura 5.3-4 – *Buccinum undatum*. Optical images and autoradiograms of tissue sections from *B. undatum* exposed to  $^{113}\text{Sn}$ -TBT along experiment time. a) at end of experiment, b) in 1 week of elimination, c) in 4 weeks of elimination and d) in 8 weeks of elimination. Scale bars represent relative radioactivity in digital light units ( $\text{DLU} \cdot \text{mm}^{-2}$ ). Abbreviations: CA-contact area; DG-digestive gland; DT-digestive tract; C-ctenidium; GN-gonad; H-heart; HG-hypobranchial gland; I-intestine; K-kidney; O-osphradium; ST-stomach; ECG-egg capsule gland; P-penis; SV-seminal vesicle.

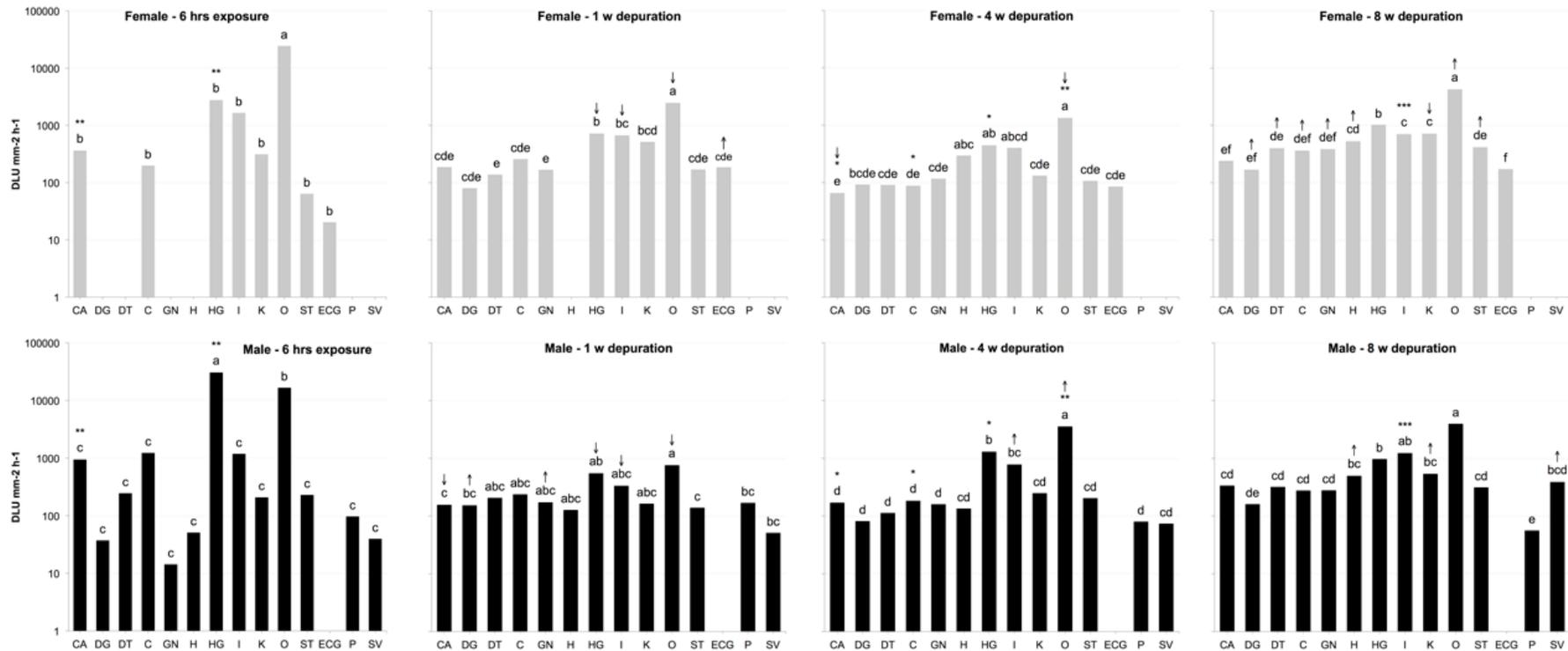


Figura 5.3-5 – *Buccinum undatum*. Radioactivity levels (DLU mm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) measured in tissues of *B. undatum* exposed 6 h to <sup>113</sup>Sn-TBT and following 1, 4 and 8 weeks of depuration). Each bar represents the mean value measured in 2-8 different sections of from one individual. No bar to indicate no radioactivity detected. Lowercase letters (a, b, c...) indicate significant differences between tissues during in each time of experiment. \* Asterisks indicate significant differences between females and males in each time of experiment (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01). Arrows to indicate if radioactivity levels improve or decrease in each tissues over time of experiment. See Figura 5.3-4 for the abbreviations used.

## Discussion

The TBT concentration used in the experiment (102 ng TBT L<sup>-1</sup>) was environmental realist and the water levels of radioactivity required for the success of autoradiography. To our knowledge, biokinetic data at such TBT concentration have been reported just two times using the WBARG in *Nucella lapillus* (Bryan *et al.*, 1993, 1989) exposed via water, diet of labeled mussels and by injection and there are no reports in the literature that used in vivo gamma counting.

Bioindicator of TBT contamination, the whelk *Buccinum undatum* had a high capacity to accumulate the tributyltin from water (*Bioconcentration Factor*, BCF > 4 x 10<sup>5</sup>). The lipophilicity of TBT as well as its moderately high octanol-water partitioning coefficient contributes to its bioaccumulation by marine organisms (Connell, 1988; Fent, 1996; Fowler, 1982; Maguirre, 2000). In previous studies with gastropods, BCF for TBT ranged between 10<sup>3</sup> (Bauer *et al.*, 1995; Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995; Stroben *et al.*, 1992) and 10<sup>4</sup> (Coelho *et al.*, 2002a; Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995; Stroben, 1994). BCF value found for TBT in the present study was the biggest of all and considered highly bioaccumulative (which means log BCF ≥ 3, following (López-Serrano Oliver *et al.*, 2011)). A true comparison between species is difficult because the way and concentrations of exposure are much diversified.

With results obtained is possible to affirm that *B. undatum* has a large capacity to bioconcentrate TBT from water. Horiguchi *et al.* (2012) analyzed dissected tissues of *Thais clavigera* from one of the most contaminated sites by organotin compounds in Japan and presented the hypothesis that TBT in seawater is taken via respiration at ctenidium and then transported to various tissues/organs. This was not confirmed in present work. *B. undatum* presented principal uptake through osphradium and hypobranchial gland. Osphradium is a sensory organ connected to the respiratory system that act like a chemo/mechano receptor (Lindberg & Sigwart, 2015) and hypobranchial gland is responsible by the secretion of mucus for trapping particulate matter that is sucked into the mantle cavity with the respiratory water current (Fretter & Graham, 1994). In one week, levels in osphradium and hypobranchial gland decreased significantly and indicated that these organs probably make up the fast-eliminating compartment in *B. undatum*.

*B. undatum* attained BCF equilibrium in approximately 60 days (70 days for males and 55 for females). Another works found BCF equilibrium after 3-4 months in *Marisa cornuaretis*, *N. lapillus* and *Hinia reticulata*, (Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995; Stroben *et al.*, 1992). TBT half-live was estimated in both sexes, approximately 3 days in the fast-eliminating compartment, and 46 and 55 days in slow-eliminating compartment in females and males, respectively. Bryan *et al* (1997) observed similar results (50 to more than 100 days) in *N. lapillus*. In *Thais clavigera* was estimated a half-live as 22 days (Horiguchi *et al.*, 1995). This variability in time depuration suggests a difference in metabolization and elimination patterns among gastropod species.

In the present study, it was clear to see the TBT uptake via osphradium and hypobranchial gland, follow to kidney, intestine, and posterior distribution to heart and, in males, seminal vesicles too. Due to its ionic characteristics, TBT has a higher affinity to proteic macromolecules like glutathione, which there is in abundance in digestive system (Appel, 2004). In mollusks the digestive gland is involved in organotins storage and detoxification (Dimitriadis *et al.*, 2004; Lee, 1991) and could represents a key organ in accumulation studies (McVeigh *et al.*, 2004). In all digestive and reproductive organs, the radioactivity significantly improves with depuration time. In the digestive gland, immediately after exposure, TBT was observed only in males, and concentrations increased significantly in males and females after 1-week depuration, remaining constant along the depuration time. Previous works suggested higher metabolic ability of *T. clavigera* and *B. japonica* to metabolize TBT in digestive gland (Horiguchi *et al.*, 2014, 2006), but it was not possible to affirm that digestive gland have a higher ability to metabolization in *B. undatum*.

There were gender differences mainly at end of exposure (6h) and 1 week of depuration. Females did not presented radioactivity in heart, digestive tract, digestive gland and gonad at end of 6 hrs of exposure. After 1 week, females still did not presented radioactivity in heart. However, at end of 8 depuration weeks, females and males showed high TBT accumulation on heart. This results are in accordance with Horiguchi *et al.*, (2012) that observed high TBT concentration in heart and osphradium from *T. clavigera* collected in one of the most contaminated sites in Japan and suggested that there are specific mechanisms of accumulation for organotins in these organs. Horiguchi *et al.*

(2012) and Wang *et al.* (2010) observed that *T. clavigera* from contaminated field and exposed in laboratory to aqueous and dietary TBT, respectively, preferentially accumulated TBT in their reproductive organs, while the male whelks tended to accumulate TBT in their digestive tissues. In present study with *B. undatum*, both sexes accumulated TBT in kidney and intestine, however, a markedly difference could to be observed in tissues accumulation qual?. Females did not accumulated TBT in their reproductive organs. On the contrary, at end of 8 depuration weeks, males showed high levels in seminal vesicle, reproductive organ responsible for a long-term storage of sperm. Digestive gland and gonads (ovary and testis), which compose the digestive gland/gonad complex, do not presented high radioactivity until the end of experiment.

This important information has implications in organotins biomonitoring. Gastropods are recognized as bioindicators of TBT pollution due to the imposex development when females are exposed to TBT. Additionally, gastropods are considered good TBT bioaccumulators and tissues analysis are often done with aiming to access the environmental condition. Actually, due to the chemical proprieties of TBT and based in the limited data, where was observed the butyltins distribution through specifics organs/tissues dissection, in many TBT biomonitoring are only used the complex gonad/digestive gland. With results obtained with autoradiography, it is worth mentioning that should be used all soft tissue of *B. undatum* in organotins tissue quantification, to avoid sub estimation about the environmental contamination.

Osphradium and hypobranchial gland maintained elevated radioactivity comparated with another tissues over depuration time. Straw & Rittschof (2004) observed an interesting discovers in *Ilyanassa obsoleta* from site with high imposex levels. Authors observed the inability of these organisms to recognize pheromonal cues from the opposite sex. Normally gastropods respond to opposite sex pheromone. However, *I. obsoleta* sampled from the high imposex sites had males and females responding equally to both pheromonal cues indicating an alteration of the pheromonal receptors or neurological processing of the pheromonal signals (McClellan-Green *et al.*, 2007). A possible explanation to this, can be the relation between TBT exposure, imposex and the occurrence of excrescences of proliferating tissue on nongenital organs, as

ctenidium and osphradium, observed in *N. lappilus* by Hagger *et al.*, (2006). These authors shown evidences about an association between DNA damage (micronucleus formation) and imposex incidence. Furthermore, they shown that there are abnormal growths of epithelial tissue, primarily associated with the reproductive organs and that, as with the micronucleus formation, the occurrence of these growths is positively correlated with the imposex stage and with the tissue concentration of TBT (Hagger *et al.*, 2006). We speculate that the high levels of radioactivity observed in osphradium also could be related with this effect.

In previous studies with vertebrates, Evans *et al.* (1979) observed that more than 90% of TBT intake by mice was rapidly excreted through feces and urine. Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1996) suggested that most TBT intake was quickly transformed and eliminated from the bodies of Steller sea lions, with less than 1% of the total amount of TBT intake being accumulated *in vivo*. Thus, it is presumed that tissue TBT concentration in vertebrate organisms may be useful in assessing the recent changes in ambient TBT levels, due to its relatively short half-life (Leung *et al.*, 2006). Although belonging to the invertebrates, our results demonstrate similar pattern in gastropods and this also have importance in TBT biomonitoring. Females have capacity to eliminate TBT in tissues in 46 days, then, when TBT was found in the tissues is evidence that females were exposed to recent TBT inputs at environment. However, if is just analyzed imposex, is possible that effect to be a reflection of old inputs (more than 50 days, in *B. undatum*, for example), since imposex is considered an irreversible condition in most species (Foale, 1993; Stroben *et al.*, 1992).

## **Conclusion**

BCF value found for TBT in present study was the biggest of related in gastropods and considered highly bioaccumulative. It was clearly observed through kinetic parameters and autoradiographic images that TBT is quickly absorbed from the aquatic environment, by osphradium and hypobranchial gland, which were considered the fast-elimination compartment because in 1 depuration week reduced about 50% of radioactivity levels. The tissues distribution in order of magnitude were: osphradium > hypobranchial gland > intestine > kidney > heart; and in males > seminal vesicle. Females did not

accumulated TBT in their reproductive organs and it is worth mentioning that all soft tissue of *B. undatum* should be used in organotins tissues quantification, to avoid sub estimation about the environmental contamination. Furthermore, females presented capacity to eliminate TBT in tissues in 46 days, then, when TBT is found in the tissues is evidence that females were exposed to recent TBT inputs at environment. In addition to knowledge about TBT distribution and toxicokinetics, results here presented add important information to improve the organotins biomonitoring studies.

### **Acknowledgments**

M. Rossato was granted a CAPES PhD scholarship and during May 2013 to October 2013 she received a CNPq scholarship during her staying at Université du Quebec à Rimouski, Canada (Proc. N° 245683/2012-7). We thank Dra. Mércia Barcellos da Costa and Dr. Ítalo Braga de Castro, for their help with gastropod anatomy.

#### 5.4. “Influência da matéria orgânica na acumulação do TBT por *Stramonita brasiliensis*”

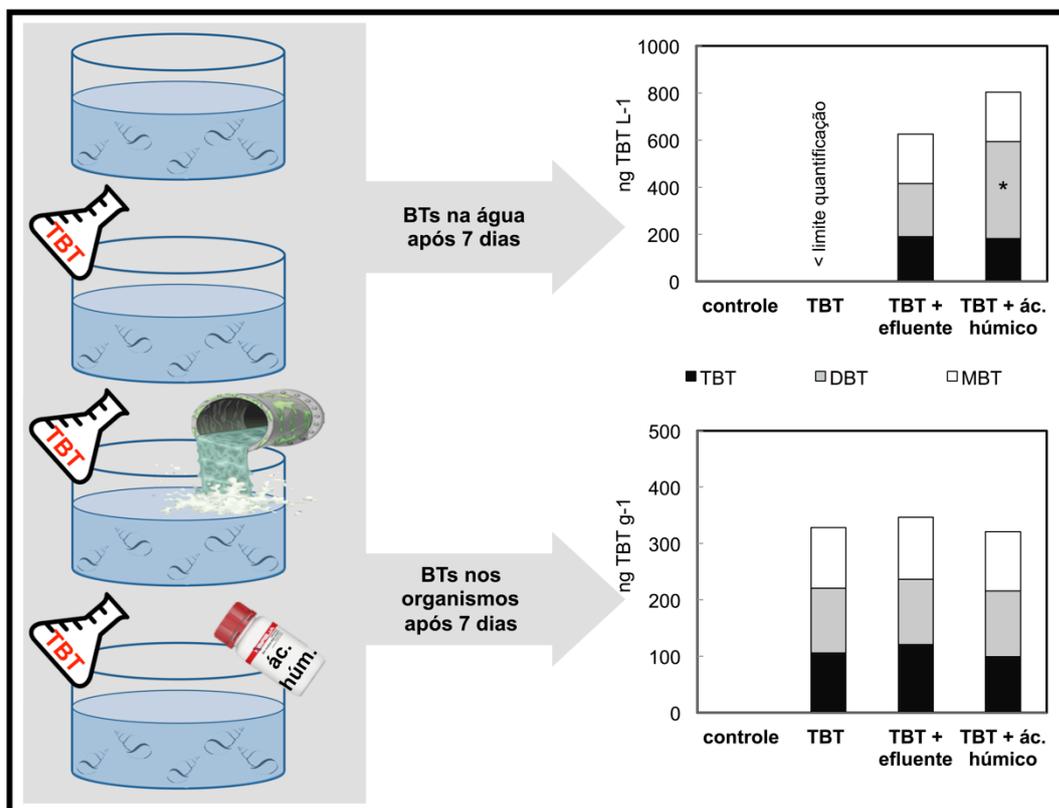
Rossato, M.; Artifon, V.; Fillmann, G.; Pinho, G.L.L.

##### Resumo

Gastrópodes são organismos globalmente conhecidos por acumularem TBT e como consequência desta exposição, desenvolvem o imposex. Este fenômeno é utilizado há mais de três décadas como biomarcador da poluição por TBT nas zonas costeiras do mundo todo. Entretanto, na literatura são encontrados resultados divergentes, mostrando tanto um aumento na capacidade dos organismos em bioconcentrar contaminantes a partir de águas com maior teor de matéria orgânica (MO), quanto estudos indicando que a MO teria um efeito protetor, reduzindo a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos e metálicos presentes na água. Assim, neste trabalho buscamos investigar a influência da MO utilizando duas origens distintas: fonte antrópica (efluente doméstico bruto) e comercial (ácido húmico comercial) na acumulação do TBT pela *Stramonita brasiliensis*. O experimento foi totalmente conduzido em água marinha artificial e os tratamentos foram: Controle, TBT, TBT + efluente e TBT + ácido húmico. A exposição teve duração de 1 semana. A partir dos resultados obtidos, não foi possível observar influência significativa dos diferentes tipos MO na acumulação dos butilestânicos e, assim, não podemos afirmar que o teor de MO também seria um fator a ser considerado no biomonitoramento utilizando o imposex.

**Palavras-chave:** acumulação, ácido húmico, efluente, gastrópodes, matéria orgânica, *Stramonita brasiliensis*, tributilestanho.

## Resumo gráfico



## Introdução

Conhecer o comportamento e a concentração dos compostos químicos no ambiente aquáticos é essencial para a compreensão e prevenção dos seus possíveis efeitos ecotoxicológicos (Fent & Looser, 1995). Além disso, a disponibilidade dos contaminantes para os organismos é um fator determinante para a bioconcentração e, conseqüentemente, influencia na sua toxicidade (Fent, 2004).

Os compostos butilestânicos (BTs) são poluentes organometálicos que possuem um átomo central de estanho ligado covalentemente a pelo menos uma cadeia butílica. Entre os BTs, o tributilestanho (TBT) foi mundialmente utilizado até meados dos anos 2000 como biocida em tintas anti-incrustantes a fim de revestir embarcações e estruturas em contato com a água do mar. Apesar da alta eficiência contra organismos incrustantes, a descoberta dos efeitos tóxicos a espécies não alvo levou a sua proibição em tintas anti-incrustantes em escala global desde 2008 (IMO). Entretanto, sua elevada persistência no ambiente (até três décadas em sedimentos mais anóxicos),

bem como seu possível uso ilegal, gera um passivo ambiental que representa alto risco para ecossistemas aquáticos. Além disso, os níveis deste contaminante detectados em matrizes bióticas ainda são preocupantes uma vez que, frequentemente, estão acima das concentrações que causam efeitos nocivos aos organismos. Além disso, dados ambientais recentes, confirmam a presença de TBT em regiões portuárias e regiões que possuem atividade de navegação, como marinas e portos pesqueiros (Anastasiou *et al.*, 2016; Furdek *et al.*, 2016).

Uma vez liberado no ambiente aquático, diversos parâmetros ambientais como concentração de material em suspensão, salinidade e pH influenciam na partição do TBT nos sistemas aquáticos (Hoch & Schwesig, 2004). A dinâmica e a biodisponibilidade do TBT bem como dos seus produtos de degradação, o dibutilestanho (DBT) e o monobutilestanho (MBT), quando liberados no ecossistema aquático, também são fortemente influenciados pelo conteúdo de matéria orgânica (MO) presente no meio (Pinochet *et al.*, 2009).

Na água, o TBT tem um tempo de residência relativamente curto, pois adsorve facilmente às partículas em suspensão. Estas, por sua vez, quando assentam no fundo, removem o TBT da coluna d'água e o transferem para o sedimento (Sigg *et al.*, 2000). No entanto, experimentos laboratoriais têm demonstrado que o TBT sofre processos de sorção-dessorção nas partículas e que o sedimento pode então atuar como uma fonte ou sumidouro de TBT na coluna d'água (Hoch & Schwesig, 2004).

A MO presente contém grupos funcionais com diferentes reatividades, os quais interagem com micropoluentes através das interações eletrostática e hidrofóbica. Sendo assim, o conteúdo de MO pode ter grande influência no processo de adsorção do TBT, bem como na sua distribuição e transporte no ambiente aquático (Harris *et al.*, 1996; Hoch & Schwesig, 2004).

As concentrações de matéria orgânica natural em água superficial variam entre 0,1 – 20 mg L<sup>-1</sup> e são compostas principalmente por substâncias húmicas (Janknecht *et al.*, 2009). Apesar das evidências de interação entre TBT e matéria orgânica, encontram-se resultados contraditórios em relação aos níveis de TBT e o teor de matéria orgânica presente na água ou no sedimento. Alguns autores têm demonstrado que existem correlações positivas significativas (Fernandez *et al.*, 2005; Randall & Weber, 1986), entretanto,

outros encontraram pouca ou nenhuma correlação entre estes parâmetros (Oliveira *et al.*, 2010; Shim *et al.*, 1999).

Devido as propriedades físico-químicas, o TBT tem caráter lipofílico e hidrofóbico (Log  $K_{ow}$  4,1). Com isso, uma vez assimilado pelos organismos aquáticos, o TBT tende a se acumular nos tecidos com alto teor lipídico (Davies & McKie, 1987; Kannan *et al.*, 1995; Wade *et al.*, 1988). Os moluscos gastrópodes são organismos amplamente conhecidos por acumularem TBT e como consequência desta exposição, desenvolvem imposex (imposição de características sexuais masculinas em fêmeas de moluscos gastrópodes (Smith, 1971)). O imposex é utilizado há mais de três décadas como biomarcador da poluição por TBT nas zonas costeiras do mundo todo. Porém, até o momento, não se tem conhecimento de nenhum estudo em laboratório avaliando se o tipo de matéria orgânica presente no meio influencia na biodisponibilidade do TBT e consequente intensidade do imposex desenvolvido pelos gastrópodes.

Sendo o imposex resultado da exposição do TBT pelos gastrópodes, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a matéria orgânica proveniente de duas origens totalmente distintas (efluente doméstico bruto e ácido húmico comercial) influencia na acumulação do TBT em um gastrópode amplamente utilizado como bioindicador da poluição por este composto no Brasil, a *Stramonita brasiliensis*.

## **Material e Métodos**

### **Preparo da soluções**

#### **Solução de ácido húmico comercial**

O ácido húmico (AH) comercial (CAS: 415-93-6) foi adquirido da Sigma-Aldrich. O preparo da solução foi baseado no trabalho de Rodrigues *et al.* 2009. Primeiramente foi preparada uma solução de NaOH na concentração de 4 g L<sup>-1</sup> em água ultrapura. Após foi preparada a solução de ácido húmico, dissolvendo-se 0,21 g de AH à solução de NaOH. A solução foi armazenada no escuro em geladeira (-4 °C)

#### **Solução de TBT**

A solução estoque de Cloreto de Tributilestanho (Sigma Aldrich), 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foi preparada em acetona. Em seguida, foi feita a solução trabalho na concentração de 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pela diluição da solução estoque. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

### **Coleta do efluente**

O efluente bruto foi coletado logo após a etapa de gradeamento, na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), localizada no bairro Parque Marinha na cidade do Rio Grande. A amostra coletada foi armazenada em frascos de vidro âmbar envolvidos com papel alumínio e mantidos sob refrigeração até o experimento (cerca de 7 dias).

### **Coleta dos organismos**

Um total de 210 organismos da espécie *Stramonita brasiliensis* foram coletados na Praia do Cal, Torres (RS). Estes foram armazenados em caixas plásticas contendo água do mar em quantidade suficiente para acomodar os organismos até o laboratório. No mesmo local também foram coletados mexilhões que foram congelados e oferecidos para os gastrópodes como alimento durante a aclimação.

### **Aclimação dos organismos**

Os gastrópodes foram mantidos em laboratório nas mesmas condições do experimento: temperatura  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12C:12E. Para isso, foi utilizada água marinha natural (salinidade 30), previamente filtrada (filtro de 1  $\mu\text{m}$ ), coletada na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da FURG e os organismos foram alimentados 2 vezes durante a semana de experimento.

### **Desenho experimental**

O experimento foi realizado com água ultrapura salinizada artificialmente, a fim de garantir menores níveis iniciais de matéria orgânica. Os tratamentos foram preparados da seguinte forma:

- **Controle:** água ultrapura salinizada artificialmente com sal artificial (Coralife Marine Salt – salinidade 30): a água utilizada em todo experimento e no restante do trabalho será chamada de “água marinha artificial”.
- **TBT (1,5 µg TBT L<sup>-1</sup>):** em 5L de água marinha artificial foi adicionado 125 µL da solução de trabalho de TBT .
- **TBT + Efluente (10% v/v):** foi adicionado 10% do volume do aquário em efluente bruto, ou seja, 500 mL de efluente em 4500 mL de água marinha artificial. Em seguida, foi adicionado 125 µL da solução de trabalho de TBT.
- **TBT + Ácido Húmico:** previamente ao experimento foi calculado a partir da análise de carbono orgânico do efluente e da solução mãe de ácido húmico, o volume de ácido húmico a ser adicionado para que a concentração de carbono total neste tratamento se assemelhasse ao tratamento TBT + Efluente. Após a preparação do meio, foi adicionado TBT como nos tratamentos acima.

O efluente bruto foi escolhido como fonte de matéria orgânica de origem antrópica por estar presente nos ambientes costeiros do mundo todo. O ácido húmico comercial representa uma parcela significativa da MO natural (Vakondios *et al.*, 2014).

Posteriormente a preparação dos tratamentos, foi retirada uma alíquota de solução de cada aquário para análise de carbono orgânico, como será descrito abaixo.

Em seguida a preparação dos tratamentos, foram adicionados aleatoriamente 30 organismos (machos e fêmeas) em cada aquário. O experimento teve duração de uma semana e os aquários foram cobertos com papel alumínio para reduzir a fotodegradação do TBT.

Foram retiradas alíquotas de água dos meios imediatamente antes da colocação dos organismos e ao final da semana de exposição para a análise de carbono orgânico e ao final da exposição também para butilestânicos em água. Os organismos foram anestesiados e sacrificados, o tecido mole destinado a análise da bioacumulação de butilestânicos.

### **Análise do carbono orgânico**

Para cada tratamento descrito anteriormente foram quantificadas as concentrações de carbono orgânico total e carbono dissolvida ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no início e no final do experimento. As análises foram realizadas a partir do método de combustão em alta temperatura, no equipamento Shimadzu TC 5000 do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FURG, seguindo a seguinte metodologia:

#### **Carbono Orgânico Total (COT):**

Uma alíquota de 50 mL de cada tratamento foi acidificada com HCl 1% até pH ~ 2 para remoção dos inorgânicos. Em seguida, foram transferidos 15 mL para um frasco âmbar previamente calcinado e identificado. O procedimento foi feito em triplicata.

#### **Carbono Orgânico Dissolvido (COD):**

Uma alíquota de 50 mL de cada tratamento foi filtrada, utilizando filtros de fibra de vidro 0,7  $\mu\text{m}$ . Posteriormente as amostras foram acidificadas com HCl 1% até pH ~ 2 e 15 mL de cada amostra transferidos para frasco âmbar previamente calcinado e identificado. O procedimento foi feito em triplicata.

#### **Análise dos butilestânicos**

Para avaliar o TBT assimilado e a capacidade de metabolização ao longo do tempo, foram analisados os tecidos (toda parte mole, retirando o opérculo) dos organismos expostos (machos e fêmeas separadamente, porém como não houve diferença, os resultados serão apresentados como média de todos os organismos). A análise química dos compostos butilestânicos nas amostras de tecido e água foi realizada de acordo com Castro *et al.*, (2015). Nas amostras de tecido a extração foi feita usando solvente orgânico (0,05% tropolona em metanol) em meio ácido seguido da extração assistida por ultrassom. Posteriormente foi realizada extração líquido-líquido (ELL) utilizando diclorometano seguida de uma etapa de derivatização com brometo de pentilmagnésio em éter dietílico. Foi realizado uma segunda ELL e os compostos pentilados foram extraídos em hexano. Os extratos orgânicos foram purificados em coluna de sílica-gel condicionada com hexano-tolueno (1:1) e analisados por cromatografia de fase gasosa utilizando um cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas (Perkin Elmer Clarus 500 MS) equipado com uma coluna Elite-5MS. O controle de qualidade foi realizado através das

análises dos brancos entre as amostras, bem como o uso de padrões de recuperação.

A partir dos níveis observados nos tecidos foram calculados o Índice de Degradação de Butilestânicos (BDI):

$$BDI = \frac{[MBT] + [DBT]}{[TBT]}$$

criado por Díez *et al.* (2002) para sedimentos e atualmente utilizado também em tecidos de organismos, onde  $BDI > 1$  indica alta degradabilidade do composto pelo organismo, e o Fator de Bioconcentração:

$$BCF = \frac{[TBT \text{ no organismo}]}{[TBT \text{ na água}]}$$

### **Análise estatística**

Os dados foram testados quanto as premissas de normalidade e homocedasticidade por Shapiro Wilks e teste de Levene, respectivamente. Diferenças entre tratamentos foram determinados por ANOVA uma via ou fatorial de duas vias. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software livre R, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

### **Resultados e discussão**

Os primeiros resultados obtidos neste estudo foram os parâmetros físico-químicos do efluente doméstico bruto no momento da coleta (Tabela 5.4-1). Em seguida foram quantificados os níveis de carbono orgânico total e dissolvido do esgoto bruto e da solução de ácido húmico comercial (Tabela 5.4-2.)

Tabela 5.4-1 – Parâmetros físico-químicos do efluente doméstico bruto, coletado na Estação de Tratamento de Rio Grande.

<b>Parâmetros físico-químicos do efluente bruto*</b>	
Temperatura	28°C
pH	7,3

Sólidos sedimentáveis	2,5 mL h <sup>-1</sup>
Sulfetos	11 mg L <sup>-1</sup>
DBO	127 mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub>
DQO	326 mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub>
Óleos e Graxas	32 mg L <sup>-1</sup>
Proteínas	0,39 mg L <sup>-1</sup>
Alcalinidade	245
Sólidos suspensos	140 mg L <sup>-1</sup>

\*Dados fornecidos pela ETE durante a coleta.

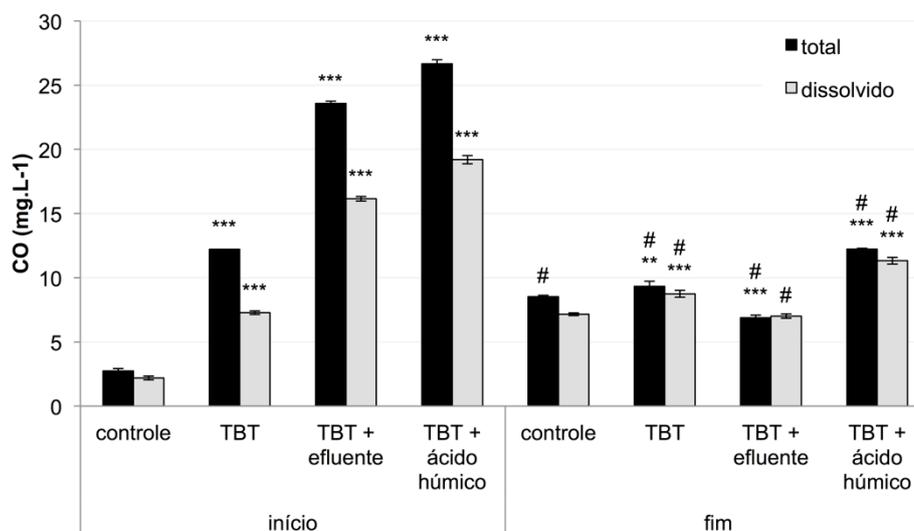
Tabela 5.4-2 – Teores de carbono orgânico (média e desvio padrão em mg L<sup>-1</sup>) das amostras de efluente doméstico bruto e ácido húmico (A.H.) comercial.

Matriz	CO Total (mg L <sup>-1</sup> )	CO Dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )
	Média ± D.P.	Média ± D.P.
Efluente bruto	78,34 ± 1,2	63,66 ± 0,97
A.H. puro	11,27 ± 0,22	7,33 ± 0,23

O trabalho de Vakondios *et al.* (2014) mostrou a complexidade da composição de um efluente de uma estação de tratamento de esgoto ao longo das diferentes etapas do tratamento. Carboidratos, proteínas e lipídeos constituem a maior parte da fração orgânica dos efluentes. Todos esses grupos têm uma redução gradual ao longo das etapas de tratamento. Por isso no presente estudo optamos por trabalhar com o efluente bruto, mesmo com todas as implicações que a complexidade da sua composição pudesse trazer para a interpretação dos resultados. Além disso, foi realizada uma comparação com ácido húmico adquirido comercialmente, nos garantindo assim uma possível comparação da influência dos diferentes grupos na acumulação do TBT.

Os resultados de carbono orgânico obtidos no início e no final do experimento estão apresentados na Figura 5.4-1. No início do experimento, todos os tratamentos apresentaram níveis de carbono total e dissolvido significativamente diferentes do controle. Para os dois tratamentos com adição de efluente e AH, os níveis de carbono orgânico apesar de significativamente diferentes entre eles, foram próximos (médias em torno de 25 mg L<sup>-1</sup> e 18 mg L<sup>-1</sup> para carbono total e dissolvido, respectivamente) e com médias

estatisticamente maiores que os níveis de carbono nos demais tratamentos. É provável que os níveis de carbono observados no tratamento contendo somente TBT sejam oriundos de contaminação durante a preparação do



experimento e em menor importância, do próprio composto butilestânico adicionado. Pequenas adições de material orgânico são passíveis de ocorrerem devido ao manuseio ao longo da execução do experimento, sendo difícil eliminar por completo o material orgânico, mesmo nos controles.

Figura 5.4-1 – Concentrações de carbono orgânico total e dissolvido nos diferentes tratamentos, ao início e final do experimento \* diferença entre tratamentos e o controle no início e ao final do experimento (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ); # diferença entre o início e o final de experimento no respectivo tratamento.

Ao final do experimento, houve redução significativa dos níveis de carbono orgânico em relação aos níveis iniciais em todos os tratamentos. Esse resultado possivelmente se deve à adsorção ou floculação da matéria orgânica. Ao final do experimento, houve redução significativa dos níveis de carbono orgânico em relação aos níveis iniciais em todos os tratamentos. Esse resultado possivelmente se deve a adsorção ou floculação da matéria orgânica presente na água, que resulta na decantação do material no fundo do aquário.

Como esperado, a análise da água dos tratamentos ao final do experimento não mostrou a presença de TBT ou dos metabólitos no aquário Controle. No entanto, no tratamento contendo somente TBT também não foram quantificados butilestânicos ( $< LQ$ ). Nos tratamentos com TBT e matéria

orgânica, os níveis de TBT, MBT e o somatório de BTs foram semelhantes entre eles. No aquário com TBT + Ácido Húmico, os níveis de DBT foram significativamente maiores que no aquário com TBT + Efluente (Figura 5.4-2 a).

Já a análise da acumulação de butilestânicos no tecido dos gastrópodes mostrou níveis semelhantes entre os organismos expostos ao TBT, indiferente da presença ou não de matéria orgânica adiciona (Figura 5.4-2 b). A partir das concentrações no tecido, foi possível calcular alguns parâmetros que permitem entender melhor a dinâmica deste contaminante quando assimilado pelos organismos no ambiente aquático: o Índice de Degradação de Butilestânicos (BDI, do inglês “*Butyltin Degradation Index*”) que indica o grau de degradação do TBT baseado nos níveis de metabólitos presentes na amostra (Díez *et al.*, 2002) e o Fator de Bioconcentração (BCF, do inglês “*Bioconcentration Factor*”) que indica a capacidade do organismo em bioconcentrar o contaminante a partir do meio aquático.

Tabela 5.4-3 – *Stramonita brasiliensis*. Índice de Degradação de Butilestânicos (BDI) e Fator de Bioconcentração (BCF), em tecido de gastrópodes expostos a 1,5 µg L<sup>-1</sup> de TBT durante 1 semana.

	<b>BDI</b>	<b>BCF</b>	<b>Log BCF</b>
<b>Controle</b>			
<b>TBT</b>	2,10	70,4	1,85
<b>TBT + Efluente Bruto</b>	1,87	80,6	1,91
<b>TBT + Ac. Húmico</b>	2,23	66,1	1,82

Todos os organismos provenientes dos tratamentos que continham TBT apresentaram BDIs altos (acima de 1), demonstrando a rápida capacidade de metabolização do TBT por *S. brasiliensis*. Isto já foi demonstrado para outras espécies em trabalhos encontrados na literatura (Anastasiou *et al.*, 2016; Lahbib *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Autores consideram que organismos que apresentam log do BCF acima de 3 possuem alta capacidade de acumulação do composto em questão (López-Serrano Oliver *et al.*, 2011). O gastrópode *Buccinum undatum*, por exemplo, apresentou BCF acima de 4 (capítulo anterior desta tese). Os valores de BCF obtidos neste trabalho indicaram baixa capacidade de acumulação para esta

espécie. Os valores calculados estão apresentados na Tabela 5.4-3. Isto também já foi demonstrado em outro estudo realizado com *S. brasiliensis* oriunda da população da praia do Cassino (RS), onde foram observados logs de BCF em torno de 2 e altas taxas de metabólitos (DBT e MBT) em organismos expostos cronicamente durante 6 meses a  $0,5 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ , sugerindo alta capacidade de metabolização do TBT pela espécie (Rossato, 2011).

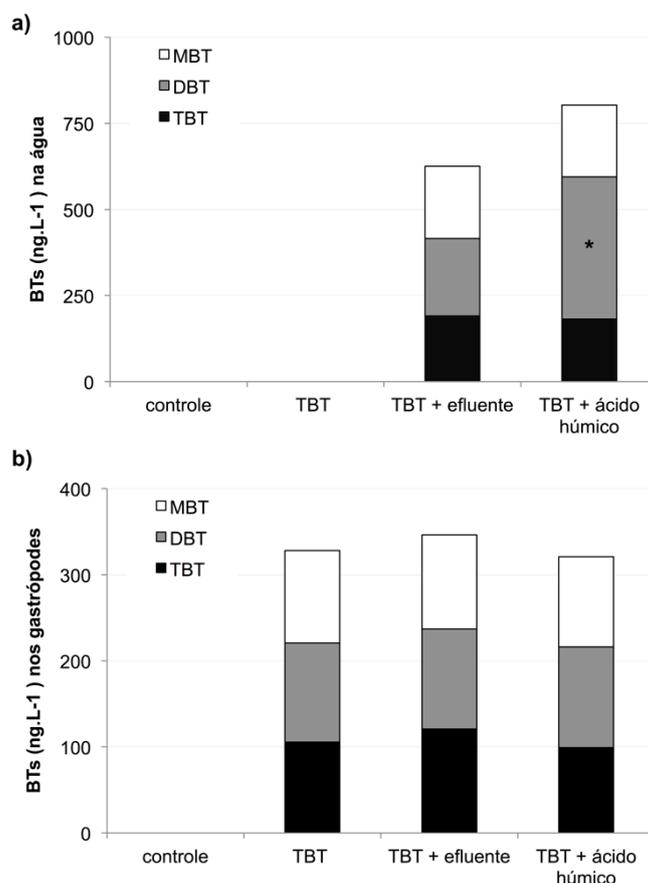


Figura 5.4-2 – *Stramonita brasiliensis*. a) Concentrações de butilestânicos na água ao final do experimento. \* diferença significativa em relação ao outro tratamento. b) Concentração de butilestânicos no tecido dos organismos ao final do experimento.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas na acumulação do TBT pelos gastrópodes, diversos estudos têm mostrado que a matéria orgânica dissolvida poderia reduzir a bioconcentração de contaminantes hidrofóbicos em organismos aquáticos (Haitzer *et al.*, 1998; Landrum *et al.*, 1996; McCarthy J.F., 1989). A redução do BCF na presença de matéria orgânica dissolvida (MOD) seria causada pela associação do

contaminante com a DOM, que formaria agregados muito grandes e muito polares, incapazes de passar pelas membranas biológicas (Haitzer *et al.*, 1999).

Os estudos prévios encontrados na literatura analisaram a influência da matéria orgânica na bioacumulação de compostos por organismos filtradores como cladóceros, tunicados, mexilhões (Haitzer *et al.*, 1998; Pinochet *et al.*, 2009) e também em algas. Até o momento nenhum estudo foi encontrado utilizando espécies carnívoras como a *S. brasiliensis*. Assim, os resultados aqui apresentados refletem a exposição ao TBT exclusivamente através das superfícies de contato do animal com a água circundante. Os trabalhos já realizados demonstraram aumento na bioacumulação do TBT e também de outros contaminantes nos organismos que habitavam ou que foram expostos a meios contendo maior teor de matéria orgânica. Alguns estudos têm demonstrado aumento significativo na bioconcentração de alguns contaminantes na presença de níveis considerados baixos de MO dissolvida ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Entretanto, ainda não existe confirmação sobre o mecanismo que controlaria o aumento no BCF pela exposição a baixos níveis de DOM (Haitzer *et al.*, 2001). Uma hipótese seria a adsorção da DOM “carregada” de contaminante na superfície do organismo, levando ao aumento no valor do BCF em relação ao controle. Já foi demonstrado por outros autores que esse complexo adsorver a superfícies biológicas, como fitoplâncton e brânquias de peixes (Campbell *et al.*, 1997). Há ainda a possibilidade sugerida por autores que utilizaram cladóceros e peixes como organismos teste, onde observou-se que os organismos ficam mais ativos ao detectar a presença de material orgânico na água, em comparação aos organismos do controle. Esse aumento na atividade levaria a um aumento no metabolismo e assim, a uma rápida assimilação no início do período de exposição.

Haitzer *et al.* (2001) estudaram compostos orgânicos marcados radioativamente (Figura 5.4-3). Segundo eles, a bioconcentração é acelerada na presença de DOM e alcança um nível maior que o controle. Se o experimento parar nesse curto espaço de tempo (ver Leversee *et al.* 1983 e Kukkonen 1989), aumentos no BCF na presença de DOM seriam reportados. Após o tempo para atingir a estabilidade, o BCF nos tratamentos com DOM

seria menor que no controle, pois a fração do contaminante ligada a DOM não é biodisponível.

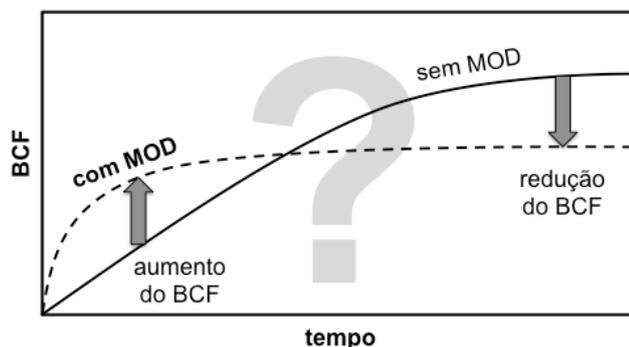


Figura 5.4-3 – Representação esquemática da influência da presença da matéria orgânica dissolvida no aumento do BCF durante o início da fase de absorção. Adaptada de Haitzer *et al.* 2001.

Além de todas as variáveis que influenciam o comportamento dos contaminantes na presença da matéria orgânica, são também observados na literatura trabalhos relatando que gastrópodes acumulariam mais TBT em condições de campo do que em experimentos em laboratório (Bryan *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1997; Oehlmann, 1994). As contaminações de TBT menores que  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  resultaram em BCFs relativamente baixos em experimentos de laboratório com outras espécies de moluscos, enquanto concentrações idênticas em condições de campo resultaram em BCFs muito maiores e esse comportamento seria consequência da presença de matéria orgânica em maiores concentrações no ambiente natural (Salazar, 1989). É preciso também considerar que experimentos de laboratório não representam a realidade do ambiente, uma vez que os organismos ficam expostos a uma ou mais vias controladas de exposição (Schulte-Oehlmann *et al.*, 1998). A água foi o meio de exposição no presente estudo, mas inúmeros trabalhos com sedimento e alimento também são encontrados na literatura. Uma possibilidade que pode estar colaborando para a ausência de variação na bioacumulação entre os tratamentos pode ser a ausência das demais vias de exposição (sedimento e principalmente, alimento).

## Conclusão

A partir deste experimento, não foi possível observar influência significativa da presença da matéria orgânica na bioacumulação dos butilestânicos.

### **Considerações**

Apesar das diversas dificuldades metodológicas observadas ao longo da execução do experimento, como a dificuldade para a produção do grande volume de água ultrapura salinizada artificialmente e o longo tempo de filtração para as amostras de carbono e butilestânicos, o experimento foi realizado com sucesso. No entanto, durante a análise dos resultados obtidos percebemos que a estratégia experimental não foi ideal. Como pode ser visto nos resultados, o TBT adicionado não foi quantificado logo após a exposição, para certificarmos a concentração inicial a que os gastrópodes foram expostos. Além disso, ao final do experimento, não foram observados butilestânicos na amostra de água do tratamento contendo apenas TBT. Isto poderia indicar uma maior bioacumulação pelos gastrópodes expostos exclusivamente ao TBT em comparação aos que estavam nos aquários contendo também matéria orgânica. No entanto, as concentrações de butilestânicos foram extremamente semelhantes entre os organismos de todos os tratamentos, com exceção do controle. Uma possibilidade poderia ser a adsorção do TBT ao vidro do aquário ou mesmo ao material particulado depositado no fundo (pellets fecais possivelmente), porém essas amostras não foram coletadas e assim não podemos sugerir o destino do TBT retirado da água.

## Capítulo VI: Síntese da Discussão e Conclusões

Somado ao conhecimento da biologia reprodutiva da espécie, este estudo traz importantes informações sobre a variação de características biofisiológicas e hormonais intrínsecas da espécie e que uma vez utilizadas na avaliação da poluição por TBT podem causar erros na interpretação dos dados. Por exemplo, a partir do cálculo do índice Peniano, observou-se claramente que os machos possuem uma retração no comportamento reprodutivo durante o inverno seguido de um aumento repentino, inclusive no tamanho do pênis, no início do verão. Essa variação pode refletir em índices de avaliação do imposex, como o RPLI (do inglês, *Relative Penis Length Index*) que leva em consideração o tamanho do pênis dos machos.

Em termos de análise metodológica, foi observada alta semelhança entre as classificações baseadas na observação macro e microscópica. Isto nos permite indicar que os estágios reprodutivos observados macroscopicamente provém informação suficiente sobre o ciclo reprodutivo de *S. brasiliensis* e podem ser usados quando uma descrição detalhada das estruturas não é necessária, como no caso de biomonitoramentos da poluição por TBT utilizando o imposex.

Conhecendo a variação biológica e reprodutiva que a espécie possui ao longo do ano, a segunda etapa do trabalho buscou avaliar se fêmeas expostas ao TBT em diferentes fases do ciclo responderiam de forma semelhante ao poluente. Após a realização dos experimentos, os resultados indicaram que as fêmeas desenvolvem imposex em ambos os períodos do ciclo reprodutivo, no entanto, são significativamente mais sensíveis ao TBT durante o verão (período de reprodução). Concomitantemente também foi analisado se o tamanho das conchas, que por sua vez reflete a idade do organismo, também poderia influenciar na sensibilidade ao TBT. As fêmeas foram classificadas de acordo com o tamanho da concha em pequenas ( $< 30$  mm), médias ( $30 > \text{mm} < 40$ ) ou grandes ( $> 40$  mm). Assim, observou-se que as fêmeas grandes são significativamente menos sensíveis ao TBT que as pequenas e médias. Se fatores biológicos como estágio reprodutivo e tamanho influenciam com tanta intensidade no desenvolvimento do imposex, qual seria a variação entre a sensibilidade de populações que habitam regiões distintas da costa brasileira?

A desconfiança de que as populações do Sul do Brasil respondem menos à exposição ao TBT surgiu em um trabalho prévio (Rossato, 2011), onde após seis meses de exposição a níveis ambientalmente altos de TBT, foi observada uma baixa indução de imposex na população de gastrópodes proveniente da praia do Cassino (RS).. Adiciona-se a estes resultados, os biomonitoramentos e trabalhos pontuais na costa brasileira, onde altos níveis de imposex foram observados em praticamente toda costa Sudeste, Nordeste e Norte, em oposição ao Sul do Brasil, onde apesar de presente, os níveis de imposex sempre foram mais baixos. A partir dos dados de imposex dos 3 experimentos, ficou claro que as fêmeas do Espírito Santo desenvolvem imposex com maior intensidade que as fêmeas do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.

Considerando a aparente variação de sensibilidade entre organismos de diferentes latitudes e que a maioria dos trabalhos e biomonitoramentos não possuem análise química dos tecidos dos gastrópodes e/ou dos sedimentos dos locais de coleta. Considerando também que estes estudos comumente não especificam época do ano para serem realizados, nem restringem classe de tamanho dos organismos, podemos acreditar que existam diversos desvios que podem não ter sido considerados na avaliação da poluição pelo TBT na costa

brasileira. Além disso, este mesmo tipo de variação pode estar acontecendo na interpretação de biomonitoramentos realizados no mundo todo, com diversas outras espécies de gastrópodes considerados bioindicadores da poluição por TBT. Entretanto, para *S. brasiliensis*, os resultados obtidos permitem também a indicação de períodos preferenciais (início do verão ou início do inverno) para a execução de biomonitoramentos, quando tendem ocorrer menores variações nos índices bio-fisiológicos, reduzindo-se assim, a possibilidade de super ou subestimação dos resultados.

Quando liberados no ambiente, os organoestânicos são rapidamente adsorvidos à partículas em suspensão e à matéria orgânica dissolvida e particulada ou são absorvidos e acumulados por organismos, causando efeitos tóxicos. Durante o período do doutorado sanduíche na *Université du Québec à Rimouski* – UQAR, Rimouski, Canadá, houve a oportunidade de realizar um trabalho com técnicas inexistentes aqui no Brasil, a contagem gama *in vivo* (IVGC) e a autorradiografia de corpo inteiro (WBARG). Utilizando TBT marcado radioativamente foi possível conhecer a toxico-cinética do TBT absorvido a partir da água, nos tecidos do gastrópode *Buccinum undatum*.

Os resultados mostraram que *B. undatum* tem alta capacidade de absorver e acumular, porém tem também alta capacidade de eliminar o TBT. Além disso, ficou claro que a assimilação do TBT se dá principalmente através dos órgãos sensoriais e respiratórios, destacando-se entre eles o osfrádio (órgão sensorial) e a glândula hipobranquial (órgão responsável pela secreção de muco para trapear o material particulado que será sugado para dentro da cavidade do manto junto com a água). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores com outras espécies, onde foi demonstrada alta acumulação no ctenídeo, osfrádio e coração de *T. clavigera* (Horiguchi *et al.*, 1998) e *B. japonica* (Horiguchi *et al.*, 2006). Os altos níveis observados no osfrádio também corroboram a hipótese de que o TBT, por ser um poluente androgênico, é capaz de causar danos diretos no DNA (Jha *et al.*, 2000b), com formação e proliferação de tecidos, inclusive tecidos não-sexuais, como no osfrádio de *N. lapillus* (Hagger *et al.*, 2006).

Observou-se claramente através dos parâmetros cinéticos e das imagens autorradiográficas, que o TBT é absorvido rapidamente do meio aquático, sendo acumulado e depurado de forma semelhante por machos e

fêmeas. Imediatamente após a exposição em meio aquático, o TBT acumula-se principalmente nos órgãos respiratórios e sensoriais. Com uma semana de depuração os níveis de TBT radioativo são significativamente reduzidos em ambos os sexos, indicando que osfrádio e glândula hipobranquial possivelmente compõe o compartimento de rápida-eliminação em *B. undatum*, de onde o TBT é eliminado em 3 dias aproximadamente.

Apesar da redução nos níveis, após uma semana de depuração, foi possível notar a distribuição do TBT pelo corpo dos organismos. Machos apresentaram aumento significativo nos níveis presentes no complexo gônada/glândula digestiva em uma semana, no intestino em quatro semanas e na vesícula seminal em 8 semanas. As fêmeas por sua vez, só elevaram significativamente os níveis no ctenídeo, nas gônadas e na glândula digestiva, no coração e no estômago após 8 semanas de depuração. Os resultados obtidos nos permitem indicar que em *B. undatum*, o TBT presente na água é assimilado principalmente via osfrádio e glândula hipobranquial, distribuindo-se para todos os tecidos do corpo, com destaque para intestino e rim, seguido de coração e em machos, vesícula seminal.

Esta informação é bastante importante para os estudos de biomonitoramento de butilestânicos, que em muitos casos analisam a acumulação dos compostos no tecido dos gastrópodes. Comumente é utilizado somente o complexo gônada/glândula digestiva, porém com a visualização da distribuição do TBT, para estudos em *B. undatum* pode-se indicar que sejam utilizadas todas as partes moles dos gastrópodes, a fim de que sejam evitadas subestimações dos níveis acumulados, uma vez que os organismos não apresentaram acumulação significativa em seus complexos gônada/glândula digestiva.

Por fim então, investigou-se a influência de um dos fatores ambientais mais importantes na partição do TBT em água, a presença de matéria orgânica na bioacumulação do TBT pelos organismos. Apesar de amplamente reconhecido que gastrópodes são capazes de acumular TBT e como consequência desta acumulação, desenvolvem o imposex, até o momento não se tem conhecimento de nenhum estudo em laboratório avaliando a influência da matéria orgânica presente na água na bioconcentração do TBT e na intensidade do imposex desenvolvido. Na literatura são encontrados resultados

divergentes, mostrando tanto aumento na capacidade dos organismos em bioconcentrar contaminantes a partir de águas com maior teor de matéria orgânica, como existem estudos indicando que a matéria orgânica teria um efeito protetor, reduzindo a bioconcentração de contaminantes orgânicos e metálicos presentes na água.

Em laboratório foi avaliada a acumulação do TBT e seus metabólitos em tecidos de *S. brasiliensis* exposta ao TBT e ao TBT + matéria orgânica de duas origens totalmente distintas (efluente doméstico bruto e ácido húmico comercial). Ao final do experimento, os resultados não permitiram observar influência significativa da presença da matéria orgânica na acumulação dos butilestânicos e assim não é possível afirmar que o teor de matéria orgânica presente no meio também deva ser um fator a ser considerado no biomonitoramento utilizando o imposex.

No entanto, a execução deste experimento e a análise dos dados nos fez perceber alguns problemas no desenho amostral executado que precisam ser corrigidos para que assim, resultados mais contundentes sejam alcançados. Aumentar o número de réplicas por tratamento, realizar análise de butilestânicos na água inicial e, principalmente, conhecer melhor o comportamento do TBT e dos seus metabólitos no meio aquático sem a presença de organismos, pois a presença destes acaba acrescentando variáveis que aumentam a dificuldade da interpretação dos resultados.

Avaliando os resultados obtidos nesta tese, fica claro que é verdadeira a hipótese levantada no início do trabalho. A avaliação da poluição por TBT a partir da utilização do imposex como biomarcador pode estar sofrendo desvios que acabam por influenciar a interpretação do biomonitoramento, uma vez que fatores biológicos, intrínsecos ao ciclo de vida da espécie bioindicadora e relacionados ao seu habitat, influenciam no desenvolvimento do imposex. Os resultados também nos permitem indicar possíveis soluções para que esses desvios sejam evitados, como realização de biomonitoramentos na mesma estação do ano e com organismos de mesmo tamanho. Também é importante que comparações entre populações sejam evitadas, uma vez que as razões para a diferente sensibilidade ainda não foi estabelecida. A utilização de todo tecido mole dos organismos na quantificação dos butilestânicos em gastrópodes também é incentivada, pois evita que contaminações recentes não

sejam observadas, uma vez que TBT demora pelo menos uma semana para atingir as gônadas.

## Capítulo VII: Referências Bibliográficas

- Abidli, S. et al. 2012. Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): Imposex induction and sex hormone levels insights. *Ecol. Indic.* 13, 13–21. doi:10.1016/j.ecolind.2011.05.001
- Abidli, S., Lahbib, Y., Menif, N. El 2009. Effects of TBT on the imposex development, reproduction and mortality in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 89, 139–146. doi:10.1017/S0025315408002282
- Alzieu, C. 1998. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean Coast. Manag.* 40, 23–36. doi:10.1016/S0964-5691(98)00036-2
- Alzieu, C. et al. 1991. Organotin compounds in the Mediterranean: A continuing cause for concern. *Mar. Environ. Res.* 32, 261–270. doi:10.1016/0141-1136(91)90047-C
- Anastasiou, T., Chatzinikolaou, E., Mandalakis, M., Arvanitidis, C. 2016. Imposex and organotin compounds in ports of the Mediterranean and the Atlantic: Is the story over? *Sci. Total Environ.* 569–570, 1315–1329. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.209

- Antizar-Ladislao, B. 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ. Int.* 34, 292–308. doi:10.1016/j.envint.2007.09.005
- Appel, K.E. 2004. Organotin compounds: toxicokinetic aspects. *Drug Metab. Rev.* 36, 763–86. doi:10.1081/DMR-200033490
- Artifon, V., Castro, Í.B., Fillmann, G. 2016. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 16047–16055. doi:10.1007/s11356-016-6745-7
- Axiak, V. et al. 2003. Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: Some further observations. *Environ. Int.* 28, 743–749. doi:10.1016/S0160-4120(02)00119-8
- Axiak, V. et al. 1995. Laboratory and field investigations on the effects of organotin (tributyltin) on the oyster, *Ostrea edulis*. *Sci. Total Environ.* 171, 117–120. doi:10.1016/0048-9697(95)04670-5
- Bangkedphol, S. et al. 2009. The partition behavior of tributyltin and prediction of environmental fate, persistence and toxicity in aquatic environments. *Chemosphere* 77, 1326–1332. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.046
- Barash, A., Zenziper, Z. 1980. Egg masses of mollusca from the mediterranean waters of israel and notes on reproduction of the fresh water species *Theodoxus jordani* and *Melanooides tuberculata*. *Veliger* 22, 299–317.
- Barroso, C., Moreira, M. 1998. Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: Implications for imposex studies. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 78, 1233–1246. doi:10.1017/S0025315400044453
- Barroso, C., Moreira, M., 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). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201, 221–232. doi:10.3354/meps201221
- Batista, R.M., Castro, I.B., Fillmann, G. 2016. Imposex and butyltin contamination still evident in Chile after TBT global ban. *Sci. Total Environ.* 566–567, 446–453. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.039
- Bauer, B. et al. 1997. The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring - results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. *Environ. Pollut.* 96, 299–309. doi:10.1016/S0269-

7491(97)00049-3

- Bauer, B. et al. 1995. TBT Effects on the Female Genital System of Littorina-Littorea - a Possible Indicator of Tributyltin Pollution. *Hydrobiologia* 309, 15–27. doi:10.1007/BF00014468
- Bech, M., Strand, J., Jacobsen, J.A. 2002. Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. *Environ. Pollut.* 119, 253–260. doi:10.1016/S0269-7491(01)00309-8
- Berto, D. et al. 2007. Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 55, 425–435. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.09.005
- Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E. 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 50, 299–317. doi:10.1007/BF02367105
- Bigatti, G. et al. 2009. Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Mar. Pollut. Bull.* 58, 695–701. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.01.001
- Børretzen, P., Salbu, B. 2009. Bioavailability of sediment-associated and low-molecular-mass species of radionuclides/trace metals to the mussel *Mytilus edulis*. *J. Environ. Radioact.* 100, 333–341. doi:10.1016/j.jenvrad.2008.12.020
- Bray, S. et al. 2012. The regional recovery of *Nucella lapillus* populations from marine pollution, facilitated by man-made structures. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 92, 1585–1594. doi:10.1017/S0025315411001317
- Bryan, G.W. et al. 1987. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 67, 525. doi:10.1017/S0025315400027272
- Bryan, G.W., Bright, D.A., Hummerstone, L.G., Burt, G. 1993. Uptake, tissue distribution and metabolism of <sup>14</sup>C-labelled tributyltin (TBT) in the dog-whelk, *Nucella lapillus*. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 73, 889–912. doi:10.1017/S0025315400034792
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Burt, G. 1988. A comparison of the effectiveness of

- tri-n-butyltin chloride and 5 other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog-whelk, *Nucella-lapillus*. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 68, 733–744.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G. 1989. Uptake and transformation of <sup>14</sup>C-labelled tributyltin chloride by the dog-whelk, *nucella lapillus*: Importance of absorption from the diet. *Mar. Environ. Res.* 28, 241–245. doi:10.1016/0141-1136(89)90237-7
- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P., Orlando, E.F. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environ. Res.* 104, 135–152. doi:10.1016/j.envres.2006.08.002
- Butler, P.A. 1985. Synoptic Review of the Literature on the Southern Oyster Drill *Thais haemastoma floridana*. *NOAA Tech. Rep.* 1–6.
- Cacciatore, F. et al. 2016a. Imposex in *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867) as a possible investigative tool to monitor butyltin contamination according to the Water Framework Directive: A case study in the Venice Lagoon (Italy). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi:10.1016/j.ecoenv.2015.12.039
- Cacciatore, F. et al. 2016b. Imposex in *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867) as a possible investigative tool to monitor butyltin contamination according to the Water Framework Directive: A case study in the Venice Lagoon (Italy). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi:10.1016/j.ecoenv.2015.12.039
- Campbell, P.G.C., Twiss, M.R., Wilkinson, K.J. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implication of toxic solutes with aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2543–2554. doi:10.1139/f97-161
- Carvalho, I., Ferreira-Jr., A., Christo, S., Absher, T. 2016. Distribution of gastropods in a rocky shore of Ilha do Mel, Paraná - Brazil. *Trop. Oceanography* 44, 66–73. doi:10.5914/2016.0125
- Cassi, R., Tolosa, I., Mora, S. d. 2008. A survey of antifoulants in sediments from Ports and Marinas along the French Mediterranean coast. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1943–1948. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.07.011
- Castro, Í.B., Cascon, H.M., Fernandez, M.A. 2000. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) as a indication of contamination by Organotin in the coastline of Fortaleza city –

- Ceará - Brazil. *Arq. Ciências do Mar* 33, 143–148.
- Castro, I.B., Costa, P., Primel, E.G., Fillmann, G. 2015. Environmental matrices effect in butyltin determinations by GC/MS. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 10, 47–53. doi:10.5132/eec.2015.01.08
- Castro, Í.B., Fillmann, G. 2012. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 955–960. doi:10.1002/etc.1794
- Castro, Í.B., Perina, F., Fillmann, G. 2012a. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1781–1799. doi:10.1007/s10661-011-2078-7
- Castro, Í.B., Rossato, M., Fillmann, G. 2012b. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 947–954. doi:10.1002/etc.1793
- Champ, M.A. 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.* 258, 21–71. doi:10.1016/S0048-9697(00)00506-4
- Chan, K.M. et al. 2008. Seasonal changes in imposex and tissue burden of butyltin compounds in *Thais clavigera* populations along the coastal area of Mirs Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 645–651. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.040
- Claremont, M., Williams, S.T., Barraclough, T.G., Reid, D.G. 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *J. Biogeogr.* 38, 1016–1032. doi:10.1111/j.1365-2699.2011.02482.x
- Clark, E. a, Sterritt, R.M., Lester, J.N. 1988. The fate of tributyltin in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 22, 600–604. doi:10.1021/es00171a001
- Coelho, M.R., Bebianno, M.J., Langston, W.J. 2002a. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. I. Water and sediments as vectors of TBT uptake. *Mar. Environ. Res.* 54, 179–192.
- Coelho, M.R., Bebianno, M.J., Langston, W.J. 2002b. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. II. Food as vector of TBT uptake. *Mar. Environ. Res.* 54, 193–207. doi:10.1016/S0141-1136(02)00106-X
- Connell, D. 1988. Bioaccumulation of tin and tributyltin from anti-fouling paint by cultivated scallops (*Pecten maximus*) and pacific oysters (*Crassostrea*

- gigas). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 101, 117–154.
- Costa, M.B. et al. 2008. First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. *Brazilian J. Oceanogr.* 56, 145–148. doi:10.1590/S1679-87592008000200007
- Couceiro, L. et al. 2009. Imposex and gender-independent butyltin accumulation in the gastropod *Nassarius reticulatus* from the Cantabrian coast (N Atlantic Spain). *Chemosphere* 76, 424–427. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.035
- D'Asaro, C.N. 1966. The egg capsules, embryogenesis and early organogenesis of a common oyster predator, *Thais haemastoma* (Gastropoda: Prosobranchia). *Bull. Mar. Sci.* 16, 884–914.
- Davies, I.M. et al. 1997. Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158, 191–204. doi:10.3354/meps158191
- Davies, I.M., McKie, J.C. 1987. Accumulation of total tin and tributyltin in muscle tissue of farmed Atlantic salmon. *Mar. Pollut. Bull.* 18, 405–407. doi:10.1016/0025-326X(87)90321-3
- de Vooy, C.G.N., van der Meer, J. 2010. The whelk (*Buccinum undatum* L.) in the western Dutch Wadden Sea in the period 1946–1970: Assessment of population characteristics and fishery impact. *J. Sea Res.* 63, 11–16. doi:10.1016/j.seares.2009.08.005
- Delucchi, F., Tombesi, N.B., Freije, R.H., Marcovecchio, J.E. 2007. Butyltin compounds in sediments of the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 132, 445–451. doi:10.1007/s10661-006-9547-4
- Díez, S., Ábalos, M., Bayona, J.M. 2002. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Res.* 36, 905–918. doi:10.1016/S0043-1354(01)00305-0
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., Cajaraville, M.P. 2004. Cytochemical and Histochemical Aspects of the Digestive Gland Cells of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in Relation to Function. *J. Mol. Histol.* 35, 501–509. doi:10.1023/B:HIJO.0000045952.87268.76
- Dowson, P.H., Bubb, J.M., Lester, J.N. 1996. Persistence and Degradation Pathways of Tributyltin in Freshwater and Estuarine Sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42, 551–562.

doi:<http://dx.doi.org/10.1006/ecss.1996.0036>

- Elhasni, K., Vasconcelos, P., Ghorbel, M., Jarboui, O. 2013. Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the Gulf of Gabès (southern Tunisia). *Mediterr. Mar. Sci.* 14, 24–35. doi:10.12681/mms.325
- Evans, S.M., Leksono, T., McKinnell, P.D. 1995. Tributyltin pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 14–21. doi:10.1016/0025-326X(94)00181-8
- Evans, W.H., Cardarelli, N.F., Smith, D.J. 1979. Accumulation and excretion of [ $^{14}\text{C}$ ]bis(tri-*n*-butyltin) oxide in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 5, 871–877. doi:10.1080/15287397909529796
- Feare, C.J. 1970. Aspects of the ecology of an exposed shore population of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.). *Oecologia* 5, 1–18. doi:10.1007/BF00345973
- Fent, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205, 223–240. doi:10.1016/j.tox.2004.06.060
- Fent, K. 1996. Ecotoxicology of Organotin Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 3–117. doi:10.3109/10408449609089891
- Fent, K., Looser, P.W. 1995. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: Influence of pH and humic acids. *Water Res.* 29, 1631–1637. doi:10.1016/0043-1354(94)00349-C
- Fernandez, M.A. et al. 2005. Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.* doi:10.1016/j.marenvres.2004.07.001
- Filipkowska, A., Kowalewska, G., Pavoni, B. 2014. Organotin compounds in surface sediments of the Southern Baltic coastal zone: a study on the main factors for their accumulation and degradation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2077–2087. doi:10.1007/s11356-013-2115-x
- Foale, S. 1993. An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Phillip Bay, Victoria. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 546–552. doi:10.1016/0025-326X(93)90404-8
- Fowler, S. 1982. Biological transfer and transport processes, in: Kulleberg, G. (Ed.), *Pollution Transfer and Transport in the Sea*. Boca Raton, Florida,

- EUA, p. 229.
- Fretter, V., Graham, A. 1994. British prosobranch molluscs: their functional anatomy and ecology, in: Society, R. (Ed.), *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*. London, p. 820. doi:10.1002/iroh.19720570626
- Furdek, M. et al. 2016. Organotin persistence in contaminated marine sediments and porewaters: In situ degradation study using species-specific stable isotopic tracers. *J. Hazard. Mater.* 307, 263–273. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.12.037
- Furdek, M. et al. 2012. Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 189–199. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.12.009
- Galante-Oliveira, S. et al. 2009. Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: evaluation of legislation effectiveness. *J. Environ. Monit.* 11, 1405–11. doi:10.1039/b900723g
- Gibbs, P.E., Bebianno, M.J., Coelho, M.R. 1997. Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution, with notes on a species (*Columbella rustica*) lacking the imposex response. *Environ. Technol.* 18, 1219–1224. doi:10.1080/09593331808616643
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W. 1996. TBT-Induced Imposex in Neogastropod Snails: Masculinization to Mass Extinction., in: *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*. pp. 212–236.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W. 1994. Biomonitoring of Tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod molluscs, in: Kees, J., Kramer (Eds.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, pp. 205–226.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W. 1987. TBT Paints and the Demise of the Dog-Whelk, *Nucella Lapillus* (Gastropoda), in: *OCEANS '87*. IEEE, Halifax, Canada, pp. 1482–1487. doi:10.1109/OCEANS.1987.1160635
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W. 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Met. Ecotoxicol. Concepts Appl.* 767–777.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Pascoe, P.L., Burt, G.R. 1987. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J.*

- Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 67, 507–523.  
doi:10.1017/S0025315400027260
- Gooding, M., LeBlanc, G. 2004. Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Invertebr. Biol.* 123, 237–243. doi:10.1111/j.1744-7410.2004.tb00158.x
- Gooding, M.P. et al. 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environ. Health Perspect.* 111, 426–430. doi:10.1289/ehp.5779
- Gravel, P. et al. 2006. Imposex in the intertidal snail *Thais brevidentata* (Gastropoda: Muricidae) from the Pacific coast of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 54, 21–26.
- Grimón, R.W.R., Osorio, M.F., Freitas, D.M., Castro, Í.B. 2016. Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: Marine protected areas under threat. *Mar. Policy* 69, 24–31. doi:10.1016/j.marpol.2016.03.017
- Hagger, J.A. et al. 2006. Is there a causal association between genotoxicity and the imposex effect? *Environ. Health Perspect.* 114, 20–26. doi:10.1289/ehp.8048
- Haitzer, M., Akkanen, J., Steinberg, C., Kukkonen, J.V.K. 2001. No enhancement in bioconcentration of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere* 44, 165–171. doi:10.1016/S0045-6535(00)00269-1
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. 1999. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 45, 147–158. doi:10.1016/S0166-445X(98)00097-6
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review. *Chemosphere.* doi:10.1016/S0045-6535(98)00117-9
- Harding, J.M., Mann, R., Kilduff, C.W. 2008. Influence of environmental factors and female size on reproductive output in an invasive temperate marine gastropod *Rapana venosa* (Muricidae). *Mar. Biol.* 155, 571–581. doi:10.1007/s00227-008-1044-6
- Harding, J.M., Unger, M.A., Jestel, E.A., Mann, R. 2016. Sex and site-specific

- trends in veined rapa whelk (*Rapana venosa*) tributyltin bioaccumulation: considerations for biomonitoring. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 20, 1–10. doi:10.1017/S0025315416000849
- Harris, J.R.W., Cleary, J.J., Valkirs, A.O. 1996. Particle-Water Partitioning and the Role of Sediments as a Sink and Secondary Source of TBT, in: Organotin. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 459–473. doi:10.1007/978-94-009-1507-7\_22
- Hoch, M. 2001. Organotin compounds in the environment: a review. *Appl. Geochemistry* 16, 719–743.
- Hoch, M., Schwesig, D. 2004. Parameters controlling the partitioning of tributyltin (TBT) in aquatic systems. *Appl. Geochemistry* 19, 323–334. doi:10.1016/S0883-2927(03)00131-8
- Horiguchi, T. et al. 2014. Development of reproductive organs in the ivory shell *Babylonia japonica*: Observations from wild populations and laboratory-reared juveniles. *Mar. Environ. Res.* 93, 4–14. doi:10.1016/j.marenvres.2013.07.003
- Horiguchi, T. et al. 2012. Specific accumulation of organotin compounds in tissues of the rock shell, *Thais clavigera*. *Mar. Environ. Res.* 76, 56–62. doi:10.1016/j.marenvres.2011.09.002
- Horiguchi, T. et al. 2006. Impact of Tributyltin and Triphenyltin on Ivory Shell (*Babylonia japonica*) Populations Monograph. doi:10.1289/ehp.8047
- Horiguchi, T. et al. 1998. Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci. Total Environ.* 214, 65–70. doi:10.1016/S0048-9697(98)00053-9
- Horiguchi, T. et al. 1995. Imposex in Japanese gastropods (neogastropoda and mesogastropoda): Effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 402–405. doi:10.1016/0025-326X(95)00133-8
- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Morita, M. 1994. Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *Thais bronni* in Japan. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 74, 651–669.
- Hotchkiss, A.K., Sternberg, R.M., LeBlanc, G.A. 2008. Environmental cues trigger seasonal regression of primary and accessory sex organs of the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *J. Molluscan Stud.* 74, 301–303.

- doi:10.1093/mollus/eyn009
- IMO 2001. Doc. AFS/CONF 26 (2001) International convention on the control of harmful antifouling systems on ships.
- JAMP 2016. TBT and imposex Indicator concept.
- Janer, G. et al. 2006a. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71, 435–44. doi:10.1016/j.steroids.2006.01.012
- Janer, G. et al. 2006b. The effect of organotin compounds on gender specific andostenodione metabolism in *Marisa cornuarietis*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 147–156.
- Janknecht, P. et al. 2009. Quantification of humic acids in surface water: effects of divalent cations, pH, and filtration. *J. Environ. Monit.* 11, 377–82. doi:10.1039/b811942b
- Jha, A.N. et al. 2000a. Detection of genotoxins in the marine environment: Adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 464, 213–228. doi:10.1016/S1383-5718(99)00188-6
- Jha, A.N., Hagger, J.A., Hill, S.J. 2000b. Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 343–350. doi:10.1002/1098-2280(2000)35:4<343::AID-EM9>3.0.CO;2-5
- Kannan, K., Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukawa, R. 1995. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. *Environ. Pollut.* 90, 279–290. doi:10.1016/0269-7491(95)00028-P
- Kideys, A.E., Nash, R.D.M., Hartnoll, R.G. 1993. Reproductive cycle and energetic cost of reproduction of the neogastropod *Buccinum undatum* in the Irish Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 73, 391–403. doi:10.1017/S002531540003294X
- Kim, G.B. et al. 1996. Accumulation of Butyltin Compounds in Risso's Dolphin (*Grampus griseus*) from the Pacific Coast of Japan: Comparison with Organochlorine Residue Pattern. doi:10.1021/ES9600486
- Lahbib, Y., Abidli, S., El Menif, N.T. 2011. Spawning and intracapsular development of *Stramonita haemastoma haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) collected in northern Tunisia. *Mar. Biol. Res.* 7, 719–726.

doi:10.1080/17451000.2011.558099

- Lahbib, Y., Abidli, S., Trigui El Menif, N. 2013. Description of imposex and butyltin burden in *Nassarius mutabilis* from the lagoon of Bizerta (northern Tunisia). *Russ. J. Mar. Biol.* 39, 70–75. doi:10.1134/S1063074013010045
- Landrum, P.F., Harkey, G.A., Kukkonen, J. 1996. Evaluation of organic contaminant exposure in aquatic organisms: The significance of bioconcentration and bioaccumulation, in: *Ecotoxicology a Hierarchical Treatment*. pp. 85–131.
- Langston, W.J. et al. 2015. Recovery from TBT pollution in English Channel environments: A problem solved? *Mar. Pollut. Bull.* 95, 551–564. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.011
- Lavrado, H.P. 1992. Seleção de presas do gastrópodo *Thais haemastoma* (L.) na região de Arraial do Cabo, RJ.
- LeBlanc, G.A., Gooding, M.P., Sternberg, R.M. 2005. Testosterone-Fatty Acid esterification: a unique target for the endocrine toxicity of tributyltin to gastropods. *Integr. Comp. Biol.* 45, 81–87. doi:10.1093/icb/45.1.81
- Lee, R.F. 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Mar. Environ. Res.* 32, 29–35. doi:10.1016/0141-1136(91)90031-3
- Leung, K.M.Y. et al. 2006. Ecological risk assessments of endocrine disrupting organotin compounds using marine neogastropods in Hong Kong. *Chemosphere* 65, 922–938. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.048
- Limaverde, A.M. et al. 2007. *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. *Mar. Environ. Res.* 64, 384–398. doi:10.1016/j.marenvres.2007.03.001
- Lindberg, D.R., Sigwart, J.D. 2015. What is the molluscan osphradium? A reconsideration of homology. *Zool. Anz.* 256, 14–21. doi:10.1016/j.jcz.2015.04.001
- López-Serrano Oliver, A. et al. 2011. Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration. *Water Res.* 45, 6515–6524. doi:10.1016/j.watres.2011.09.052
- Lyssimachou, A., Bachmann, J., Porte, C. 2008. Short-term exposure to the organotin compound triphenyltin modulates esterified steroid levels in females of *Marisa cornuarietis*. *Aquat. Toxicol.* 89, 129–135.

- doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.009
- Lyssimachou, A., Ramón, M., Porte, C. 2009. Comparative study on the metabolism of the androgen precursor androstenedione in two gastropod species: In vitro alterations by TBT and TPT. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 409–413. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.015
- Maguirre, R.J. 2000. Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's toxic substances management policy. *Water Qual. Res. J. Canada* 35, 633–679.
- Markov, G. V. et al. 2009. Independent elaboration of steroid hormone signaling pathways in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 11913–11918. doi:10.1073/pnas.0812138106
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E. 1998. A critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37–43.
- Mattos, Y. et al. 2017. Butyltin contamination in Northern Chilean coast: Is there a potential risk for consumers? *Sci. Total Environ.* 595, 209–217. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.264
- McCarthy J.F. 1989. Bioavailability and Toxicity of Metals and Hydrophobic Organic Contaminants, in: *Aquatic Humic Substances, Influence on Fate and Treatment of Pollutants.* pp. 263–277.
- McClellan-Green, P., Romano, J., Oberdörster, E. 2007. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environ. Res.* 104, 183–191. doi:10.1016/j.envres.2006.09.008
- McVeigh, A. et al. 2004. A carbon and nitrogen flux model of mussel digestive gland epithelial cells and their simulated response to pollutants. *Mar. Environ. Res.* 58, 821–827. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.099
- Mensink, B.P. et al. 2002. Imposex induction in laboratory reared juvenile *Buccinum undatum* by tributyltin (TBT). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 49–65. doi:10.1016/S1382-6689(01)00106-5
- Mensink, B.P. et al. 1996. Tributyltin exposure in early life stages induces the development of male sexual characteristics in the common whelk, *Buccinum undatum*. *Mar. Environ. Res.* 42, 151–154. doi:10.1016/0141-1136(95)00041-0
- Metian, M. et al. 2008. Investigation of Ag in the king scallop *Pecten maximus*

- using field and laboratory approaches. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 367, 53–60. doi:10.1016/j.jembe.2008.08.019
- Micael, J., Reis-Henriques, M.A., Carvalho, A.P., Santos, M.M. 2007. Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Int.* 33, 1035–1039. doi:10.1016/j.envint.2007.06.004
- Michel, P., Averty, B. 1999. Distribution and fate of tributyltin in surfaces and deep waters of the Northwestern Mediterranean. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2524. doi:10.1021/es981254b
- Morton, B. 2009. Recovery from imposex by a population of the dogwhelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda: Caenogastropoda), on the southeastern coast of England since May 2004: A 52-month study. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1530–1538. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.05.012
- Narváez, C.T. et al. 2002. La Reproducción de bivalvos y gasterópodos de interés pesquero en Andalucía, Recursos Pesqueros.
- Nyberg, E. et al. 2013. Tributyltin ( TBT ) and imposex [WWW Document]. *HELCOM Core Indic. Hazard. Subst.* URL [http://helcom.fi/CoreIndicators/Forms/Hazardous substance core indicators.aspx](http://helcom.fi/CoreIndicators/Forms/Hazardous%20substance%20core%20indicators.aspx)
- Oberdörster, E., McClellan-Green, P. 2000. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21, 1323–1330. doi:10.1016/S0196-9781(00)00274-6
- Oehlmann, J. 1994. Imposex bei Muriciden (Gastropoda, Prosobranchia), eine ökotoxikologische Untersuchung zu TBT-Effekten. Münster (Westfalen), Universität.
- Oehlmann, J., Fioroni, P., Stroben, E., Markert, B. 1996. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): Imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci. Total Environ.* 188, 205–223. doi:10.1016/0048-9697(96)05173-X
- Okoro, H.K. et al. 2011. Sources, environmental levels and toxicity of organotin in marine environment - A review. *Asian J. Chem.*
- Oliveira, C.R., Santos, DayanaMoscardiSantos Madureira, L.A., Marchi, M.R.R. 2010. Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian harbors. *J. Hazard. Mater.* 181, 851–856.

- doi:10.1016/j.jhazmat.2010.05.091
- Oliveira Ribeiro, C.A. et al. 2007. Histopathological evidence of antagonistic effects of tributyltin on benzo[a]pyrene toxicity in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Sci. Total Environ.* 372, 549–553. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.10.005
- Padrós, J., Pelletier, E., Reader, S., Denizeau, F. 2000. Mutual In Vivo Interactions Between Benzo[ a ]pyrene and Tributyltin in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1019–1027. doi:10.1002/etc.5620190431
- Padrós, J., Pelletier, É., Ribeiro, C.A.O. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): A long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192, 45–55. doi:10.1016/S0041-008X(02)00042-X
- Pellizzato, F. et al. 2004. Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. *Sci. Total Environ.* 332, 89–100. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.03.036
- Pinochet, H. et al. 2009. Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay—Chile. *Environ. Monit. Assess.* 155, 341–353. doi:10.1007/s10661-008-0439-7
- Primost, M.A., Giulianelli, S., Gil, M.N., Bigatti, G. 2015. Acute toxicity in two edible marine gastropods with different sensitivity to tributyltin. *Panam. J. Aquat. Sci.* 10, 172–178. doi:10.13140/RG.2.1.1881.6724
- Quintela, M., Barreiro, R., Ruiz, J.M. 2000. The use of *Nucella lapillus* (L.) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution, in: *Science of the Total Environment*. pp. 227–237. doi:10.1016/S0048-9697(00)00367-3
- Ramírez, R., Tuya, F., Haroun, R.J. 2009. Spatial patterns in the population structure of the whelk *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1766) (Gastropoda: Muricidae) in the Canarian Archipelago (eastern Atlantic). *Sci. Mar.* 73, 431–437. doi:10.3989/scimar.2009.73n3431
- Ramón, M., Amor, M.J. 2002. Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* and penis and genital duct size variations in a population affected by imposex. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 82, 435–442. doi:10.1017/S0025315402005696
- Ramorino, L. 1975. Ciclo reproductivo de *Concholepas concholepas* en la zona

- de Valparaíso. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 15, 149–177.
- Randall, L., Weber, J.H. 1986. Adsorptive behavior of butyltin compounds under simulated estuarine conditions. *Sci. Total Environ.* 57, 191–203. doi:10.1016/0048-9697(86)90023-9
- RCoreTeam 2013. R: A language and environment for statistical computing. [WWW Document]. *R Found. Stat. Comput.* URL <http://www.r-project.org/>.
- Rewitz, K.F., Styriehave, B., Løbner-Olesen, A., Andersen, O. 2006. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* doi:10.1016/j.cbpc.2006.04.001
- Rilov, G., Benayahu, Y., Gasith, A. 2001. Low abundance and skewed population structure of the whelk *Stramonita haemastoma* along the Israeli Mediterranean coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 218, 189–202. doi:10.3354/meps218189
- Rios, E.C. 1985. Seashells of Brazil. Fundação Cidade do Rio Grande, Fundação Universidade do Rio Grande, Museu Oceanográfico.
- Roller, R.A., Stickle, W.B. 1988. Intracapsular development of *Thais haemastoma canaliculata* (Gray) (Prosobranchia: Muricidae) under laboratory conditions. *Amer. Malac. Bull.* 6, 189–197.
- Ronis, M.J.J., Mason, A.Z. 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of tributyltin, in: Marine Environmental Research. pp. 161–166. doi:10.1016/0141-1136(95)00069-0
- Rossato, M. 2011. Avaliação do gastrópode *Stramonita haemastoma* como biodicador da contaminação por Tributilestanho. Universidade Federal do Rio Grande.
- Rossato, M., Castro, Í.B., Pinho, G.L.L. 2014. Imposex in *Stramonita haemastoma*: a preliminary comparison between waterborne and dietborne exposure. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 9, 87–92. doi:10.5132/eec.2014.01.011
- Rouleau, C. 1998. Synthesis of radioactive <sup>113</sup>Sn-tributyltin of high specific activity for use in environmental fate studies . Synthesis of Radioactive Tributyl [ <sup>113</sup> Sn ] tin of High Speci ® c Activity for Use in Environmental Fate Studies . *Appl. Organomet. Chem.* 12, 435–438.

- Ruiz, J.M. et al. 2010. Decade-long monitoring reveals a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 931–934. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.04.005
- Sakr, A.A., Osman, G.Y., Abo-Shafey, A.E. 1992. Effect of testosterone on the ovotestis of the land snail *Theba pisana*. *Funct. Dev. Morphol.* 2, 99–101.
- Salazar, M.H. 1989. Mortality, growth and bioaccumulation In mussels exposed to TBT: differences between the laboratory and the field, in: OCEANS '89. IEEE, pp. 530–536. doi:10.1109/OCEANS.1989.586816
- Santos, M.M. et al. 2005. New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 141, 101–109. doi:10.1016/j.cca.2005.05.008
- Santos, M.M. et al. 2002. Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk *Buccinum undatum* from the open North Sea, in: Marine Environmental Research. pp. 661–665. doi:10.1016/S0141-1136(02)00150-2
- Santos, M.M., Armanda Reis-Henriques, M., Natividade Vieira, M., Solé, M. 2006. Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 155–162. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.003
- Schulte-Oehlmann, U. et al. 1998. Toxicokinetic and dynamic aspects of TBT-induced imposex in *Hydrobia ulvae* compared with intersex in *Littorina littorea* (Gastropoda, Prosobranchia). *Hydrobiologia* 378, 215–225. doi:10.1023/A:1003270528688
- Schulte-Oehlmann, U. et al. 1995. *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, prosobranchia): a potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology* 4, 372–384. doi:10.1007/BF00118872
- Shim, W.J. et al. 1999. Horizontal distribution of butyltins in surface sediments from an enclosed bay system, Korea. *Environ. Pollut.* 106, 351–357. doi:10.1016/S0269-7491(99)00109-8
- Sigg, L., Bhera, P., Stumm, W. 2000. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, in: Chimie Des Milieux Aquatiques. Dunod, Paris, pp. 515–519.
- Smith, B.S. 1971. Sexuality in the american mud snail, *nassarius obsoletus* say. *J. Molluscan Stud.* 39, 377–378.

doi:10.1093/oxfordjournals.mollus.a065117

- Solon, E.G. 2015. Autoradiography techniques and quantification of drug distribution. *Cell Tissue Res.* doi:10.1007/s00441-014-2093-4
- Solon, E.G., Balani, S.K., Lee, F.W. 2002. Whole-body autoradiography in drug discovery. *Curr. Drug Metab.* 3, 451–462. doi:10.2174/1389200023337207
- Sousa, A. et al. 2009. Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* 77, 566–573. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.049
- Spence, S.K., Hawkins, S.J., Santos, R.S. 1990. The mollusc *Thais haemastoma* An Exhibitor of Imposex and Potential Biological Indicator of Tributyltin Pollution. *Mar. Ecol.* 11, 147–156. doi:10.1111/j.1439-0485.1990.tb00235.x
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L. 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar. Environ. Res.* 32, 37–49.
- Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A. 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology.* doi:10.1007/s10646-009-0397-z
- Sternberg, R.M., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A. 2008. The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 15–26. doi:10.1016/j.ygcen.2007.12.002
- Strand, J., Glahder, C.M., Asmund, G. 2006. Imposex occurrence in marine whelks at a military facility in the high Arctic. *Environ. Pollut.* 142, 98–102. doi:10.1016/j.envpol.2005.09.014
- Strand, J., Jacobsen, J.A. 2002. Imposex in two sublittoral neogastropods from the Kattegat and Skagerrak: The common whelk *Buccinum undatum* and the red whelk *Neptunea antiqua*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244, 171–177. doi:10.3354/meps244171
- Straw, J., Rittschof, D. 2004. Responses of mud snails from low and high imposex sites to sex pheromones. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 1048–1054. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.010
- Stroben, E. 1994. Imposex und weitere Effekte von chronischer TBT-

- Intoxikation bei einigen Mesogastropoden und Bucciniden (Gastropoda, Prosobranchia). 193p.
- Stroben, E., Oehlmann, J., Fioroni, P. 1992. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributultin pollution. *Mar. Biol.* 113, 625–636. doi:10.1007/BF00349706
- Tiano, L., Fedeli, D., Moretti, M., Falcioni, G. 2001. DNA damage induced by organotins on trout-nucleated erythrocytes. *Appl. Organomet. Chem.* 15, 575–580. doi:10.1002/aoc.207
- Titley-O’Neal, C.P., Munkittrick, K.R., Macdonald, B. a 2011. The effects of organotin on female gastropods. *J. Environ. Monit.* 13, 2360–2388. doi:10.1039/c1em10011d
- Toste, R. et al. 2013. Is aphyllous vas deferens development in females related to the distance from organotin sources? A study with *Stramonita haemastoma*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 162–170. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.026
- Turner, A., Glegg, G. 2014. TBT-based antifouling paints remain on sale. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2014.08.041
- Ullberg, S., Larsson, B., Tjälve, H. 1982. Autoradiography, in: Gleen, H. (Ed.), *Biological Applications of Radiotracers*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 56–108.
- Vakondios, N., Koukouraki, E.E., Diamadopoulos, E. 2014. Effluent organic matter (EfOM) characterization by simultaneous measurement of proteins and humic matter. *Water Res.* 63, 62–70. doi:10.1016/j.watres.2014.06.011
- Van Den Broeck, H., De Wolf, H., Backeljau, T., Blust, R. 2009. Comparative assessment of reproductive impairment in the gastropod mollusc *Littorina littorea* along the Belgian North Sea coast. *Sci. Total Environ.* 407, 3063–3069. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.12.050
- Vasconcelos, P., Gaspar, M., Castro, M. 2006. Imposex in *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) from the Ria Formosa lagoon (Algarve coast—southern Portugal). *Mar. Pollut. Bull.*
- Vasconcelos, P., Lopes, B., Castro, M., Gaspar, M.B. 2008. Gametogenic cycle of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) in the Ria Formosa lagoon (Algarve coast, southern Portugal). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 88, 321–329. doi:10.1017/S0025315408000593

- Vasconcelos, P., Moura, P., Barroso, C., Gaspar, M.B. 2012. Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the Ria Formosa lagoon. *Aquat. Biol.* 16, 69–83. doi:10.3354/ab00434
- Vasconcelos, P., Moura, P., Barroso, C.M., Gaspar, M.B. 2011. Size matters: Importance of penis length variation on reproduction studies and imposex monitoring in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). *Hydrobiologia* 661, 363–375. doi:10.1007/s10750-010-0544-9
- Vos, J.G. et al. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71–133. doi:10.1080/10408440091159176
- Wade, T.L., Garcia-Romero, B., Brooks, J.M. 1988. Tributyltin contamination in bivalves from USA coastal estuaries. *Environ. Sci. Technol.* 22, 1488–1493. doi:10.1021/es00177a016
- Wang, X., Fang, C., Hong, H., Wang, W.X. 2010. Gender differences in TBT accumulation and transformation in *Thais clavigera* after aqueous and dietary exposure. *Aquat. Toxicol.* 99, 413–422. doi:10.1016/j.aquatox.2010.06.001
- Wang, Z. et al. 2014. The difference between temperate and tropical saltwater species' acute sensitivity to chemicals is relatively small. *Chemosphere* 105, 31–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.066
- Wayne, N.L. 2001. Regulation of seasonal reproduction in mollusks. *J. Biol. Rhythm.* 16, 391–402. doi:10.1177/074873001129002097