



volume 5 • número 2 • p 75-87

A história de um biomarcador de sucesso: o imposexo em gastrópodes como ferramenta de estudo no ensino experimental das ciências

O imposexo consiste no desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de gastrópodes, como consequência da exposição a tributilestanho (TBT), um biocida utilizado em tintas antivegetativas, usadas na prevenção da bioincrustação. O imposexo é, por isso, utilizado como biomarcador da poluição por TBT e considerado o melhor exemplo de disrupção endócrina. Pretende-se, com este trabalho, descrever a metodologia para a execução e avaliação dos níveis de imposexo, usando como base fotografias e vídeos, com o objetivo de clarificar as várias etapas do processo para que este seja realizado em qualquer escola. Como caso de estudo, foi utilizado o gastrópode *Nassarius reticulatus* e foram escolhidas duas áreas em que a contaminação por TBT é distinta e conhecida: Aveiro e Viana do Castelo. Após aplicação da metodologia, foram estudados os seguintes índices: comprimento médio do pénis das fêmeas (FPLI), comprimento médio do pénis dos machos (MPLI), comprimento relativo do pénis das fêmeas (RPLI), índice da sequência do vaso deferente (VDSI), e incidência de fêmeas afetadas (I%). Os resultados obtidos demonstram que os níveis de imposexo em Aveiro são inferiores aos registados em Viana do Castelo com incidências de 37% e 100%, respetivamente. Apesar dos níveis reduzidos registados em Aveiro (VDSI=0,4), esta estação ainda não cumpre o requisito de qualidade ecológica proposto pela OSPAR (VDSI<0,3). Assim, a monitorização futura destes locais torna-se importante para registrar a progressão deste fenómeno.

Palavras-chave

biomarcador
disrupção endócrina
tributilestanho (TBT)
imposexo
Nassarius reticulatus
tintas antivegetativas

Ana R Barros¹

Rúben TS Mendes¹

Gabriela C Santos¹

Ana CA Sousa^{2*}

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

² Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal; CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Unidade de Saúde e Ambiente, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

* anasousa@ua.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

Bioincrustação e necessidade de tintas antivegetativas

Quando uma estrutura se encontra imersa em água rapidamente é colonizada por uma enorme diversidade de organismos marinhos. Este fenómeno designa-se por bioincrustação e tem como consequência o aumento da rugosidade da superfície submersa (Figura 1).

Este processo ocorre em duas etapas distintas: em primeiro lugar ocorre a bioincrustação primária, que se inicia no momento em que a superfície é submersa, sendo constituída maioritariamente por bactérias, protozoários, diatomáceas e esporos de outras algas; em seguida, acontece a bioincrustação secundária, que se caracteriza pela presença de organismos mais complexos, como por exemplo moluscos, esponjas e cracas (Figura 2) (Omae, 2003). Este fenómeno, transversal a todas as estruturas submersas, tem como consequência o aumento do atrito. No caso particular dos navios, o aumento do atrito leva a uma diminuição da velocidade, o

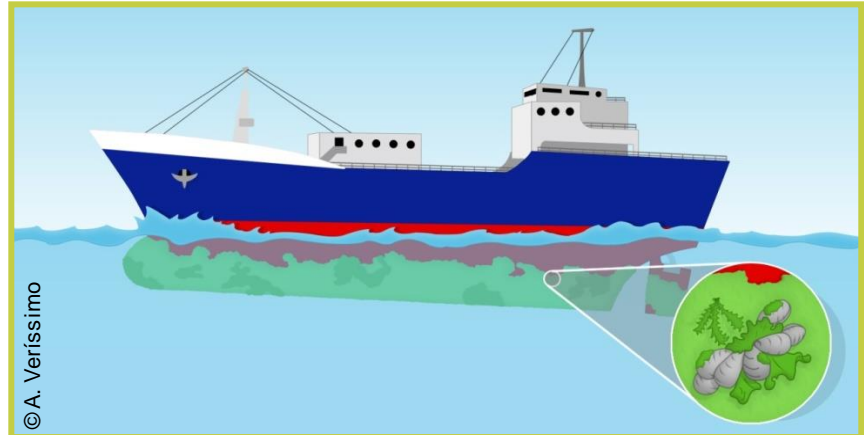


FIGURA 1: Ilustração do fenómeno de bioincrustação. Ilustração por A. Veríssimo (2014).

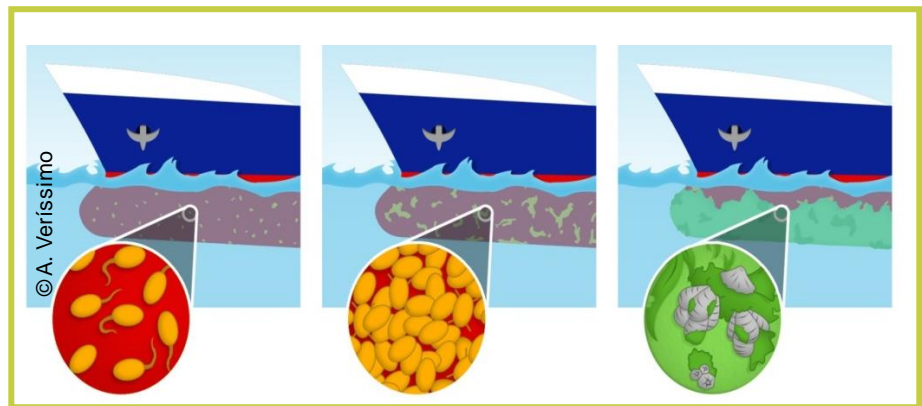


FIGURA 2: Etapas da bioincrustação (primária e secundária). Ilustração por A. Veríssimo (2014).

que se traduz num aumento do consumo de combustível, e ainda num aumento da corrosão do casco, gerando gigantescos problemas à indústria naval. Estima-se que durante meio ano, um navio no mar acumule cerca de 150 Kg m^{-2} de organismos incrustantes, e que para manter a sua velocidade aumente o consumo de combustível em cerca de 40% (IMO, 1999). No combate à bioincrustação, são utilizadas tintas antivegetativas, que consistem numa matriz contendo um ingrediente biocida e pigmentos (Hoch, 2001). A libertação gradual do biocida a partir da matriz forma uma “capa” que repele os organismos incrustantes. As tintas antivegetativas são de uma enorme importância. Para além de reduzirem o consumo de combustível e assim reduzirem as emissões quer de dióxido de carbono quer de enxofre para a atmosfera, também diminuem a possibilidade de introdução de novas espécies (espécies exóticas) nos ecossistemas (Abel, 2000; Omae, 2003). São vários os compostos usados pela indústria naval como biocidas, sendo o tributilestanho (TBT) um dos mais conhecidos e utilizados nas últimas décadas. Este biocida de largo espectro foi introduzido no início da década de 60. Aquando da sua introdução, o TBT era considerado como o “biocida ideal”, não só devido à sua elevada versatilidade mas também porque se julgava que não

era persistente no ambiente uma vez que era rapidamente degradado pela luz ultravioleta e por microrganismos (Omae, 2003). No entanto, este composto tende a adsorver à matéria orgânica em suspensão, sendo acumulado nos sedimentos onde pode permanecer durante décadas (Dowson et al., 1996). A utilização em grande escala do TBT acabou por conduzir a uma contaminação global dos oceanos, chegando mesmo a atingir zonas remotas como a Antártida (Negri et al., 2004) e a Grande Barreira de Recife de Corais na Austrália (Marshall et al., 2002).

Os primeiros relatos dos efeitos negativos do TBT em organismos que não eram o alvo deste princípio ativo começaram a surgir na década de 70. A primeira evidência foi registada na Baía de Arcachon, na costa Atlântica francesa, local caracterizado pela presença de inúmeras marinas com embarcações de recreio e pela cultura intensiva de ostras, particularmente da espécie *Crassostrea gigas* (Alzieu, 2000). Na altura registou-se um colapso na produção de ostras que estava relacionado com uma grande quebra reprodutiva, motivada por uma elevada mortalidade larvar. Por outro lado, observou-se o aparecimento de anomalias na calcificação das conchas. Foi verificado um espessamento das conchas *C. gigas*, o que levou à diminuição do volume da parte comestível e consequentemente a graves prejuízos a nível económico (Alzieu, 2000). Estes problemas foram associados à elevada concentração de TBT nas águas da baía, uma vez que ele era usado nas inúmeras embarcações que existiam nas marinas (Alzieu, 1998). Já anteriormente, nesta baía, se tinha verificado uma forte diminuição da densidade populacional do gastrópode *Ocenebra erinacea*, facto que deveria ter sido encarado como um primeiro sinal de aviso. No entanto, como esta espécie era considerada uma praga, por ser um predador das ostras, a sua quase extinção não foi considerada um problema (Santillo et al., 2001). Ainda no início da década de 70, surgiram nos Estados Unidos e em Inglaterra relatos do aparecimento de características sexuais masculinas em fêmeas de gastrópodes, fenómeno designado por imposexo (Blaber, 1970; Smith, 1971). Uma década mais tarde foi estabelecida a ligação entre este fenómeno e a presença de TBT no ambiente aquático (Smith, 1981a; Smith, 1981b). Estudos posteriores permitiram verificar que a intensidade deste fenómeno era dependente da concentração de TBT no meio e que, em locais muito contaminados, as fêmeas se encontravam de tal forma afetadas, que o desenvolvimento do canal deferente bloqueava a vulva, levando à sua esterilização. Este fenómeno causou um declínio populacional que em casos extremos conduziu mesmo à extinção local de populações (Bryan et al., 1986; Gibbs et al., 1988) (ver seção do imposexo). Vários estudos foram entretanto efetuados, tendo-se verificado que o TBT apresentava uma toxicidade elevada para inúmeros organismos de vários grupos distintos, desde as bactérias até aos mamíferos marinhos (Alzieu, 1998). Este composto foi mesmo considerado como o composto mais tóxico que alguma vez foi produzido e deliberadamente introduzido no meio marinho (Goldberg, 1986).

Legislação associada ao uso de TBT

A elevada persistência e toxicidade do TBT levaram à criação e implementação de regulamentos em vários países ao longo destas últimas décadas, de modo a minimizar a sua introdução no ambiente marinho. As primeiras medidas foram adotadas pelo Ministério Francês do Ambiente em 1982, em consequência da diminuição na produção de ostras na Baía de Arcachon. O governo francês proibiu a utilização de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 metros, e quatro anos mais tarde, o Reino Unido proibiu a venda de tintas antivegetativas à base de TBT para embarcações com comprimento inferior a 25 metros e em estruturas utilizadas em aquacultura, devido ao grave impacto ecológico deste composto sobre as

populações de gastrópodes (Alzieu, 1998). Entretanto outros países adotaram proibições semelhantes. No ano de 1989, a União Europeia introduziu a Diretiva 89/677/CEE, banindo o uso de TBT em pequenas embarcações (< 25m). Em Portugal, esta diretiva foi transposta para o direito interno pelo D.L. 54/93 de 26 de Fevereiro de 1993. No entanto, a primeira iniciativa foi adotada um ano antes (1992), quando o TBT e tintas à base deste composto foram proibidos pela frota da Marinha Portuguesa (Sousa et al., 2013). Após a implementação destas medidas, verificou-se uma diminuição dos níveis de TBT na água, assim como um declínio na intensidade do imposexo e da deformação da concha nas ostras, em locais que antes estavam muito contaminados (Alzieu, 1998). No entanto, esta recuperação não foi generalizada, limitando-se a localizações geográficas restritas bem como a espécies específicas (Sousa et al., 2013).

Em Portugal, por exemplo, rastreios efetuados ao longo da Costa Portuguesa no ano de 2000 registaram um aumento nos níveis de imposexo, sete anos após a introdução da legislação (Barroso e Moreira, 2002a; Santos et al., 2002). Face a todas as evidências científicas de que a proibição parcial não foi eficaz na redução do imposexo e nos níveis de TBT, e com a necessidade de proteger o ambiente marinho, a Organização Marítima Internacional (IMO) decidiu avançar com a proibição total da utilização de TBT através da Convenção AFS, "International Convention on the Control of Harmful Antifoulings on Ships". A convenção propunha que tintas com TBT não podiam ser aplicadas ou reaplicadas em nenhuma embarcação a partir de 1 de Janeiro de 2003, e os navios não podiam conter estas tintas após 1 de Janeiro de 2008. A partir desta data, os navios que ainda possuíssem tintas à base deste composto nos seus cascos teriam que remover a pintura ou colocar uma película que evitasse a libertação de TBT para o ambiente. No entanto, esta convenção só entraria em vigor 12 meses após a ratificação por 25 Estados Membros. Tal só aconteceu em Setembro de 2007, tendo esta proibição à escala global entrado em vigor apenas em Setembro de 2008. Antevendo as dificuldades inerentes à implementação da Convenção AFS, a Comunidade Europeia decidiu criar legislação própria: a Diretiva 2002/62/CE e Regulamento 782/2003. Com efeitos imediatos, estas peças legislativas instituíram a proibição total da aplicação de TBT a partir de Julho de 2003, e a sua presença em cascos de navios a circular nas águas sob jurisdição europeia a partir de Janeiro de 2008 (Sousa et al., 2013).

Imposexo

Tal como referido anteriormente, um dos principais efeitos negativos do TBT é o aparecimento de características sexuais masculinas (vaso deferente e/ou pénis) em fêmeas de gastrópodes. Este fenómeno foi pela primeira vez descrito em Inglaterra, por Blaber (1970) em *Nucella lapillus*, e um ano mais tarde Smith (1971) verificou o mesmo em fêmeas de *Ilyanassa obsoleta* colhidas na costa do Connecticut nos EUA e designou este fenómeno como imposexo. A relação causa-efeito foi estabelecida em 1981, e o TBT foi considerado o indutor destas anomalias (Smith 1981 a; Smith, 1981b). Este fenómeno já foi relatado em mais de 200 espécies de gastrópodes em todo o mundo (Shi et al., 2005). O imposexo é considerado como o melhor exemplo de disrupção endócrina conhecido (Matthiessen e Gibbs, 1998). O aparecimento das alterações sexuais nas fêmeas ocorre como resposta à exposição ao TBT, um potente desregulador endócrino¹. Assim, o imposexo é usado como biomarcador bastante específico da poluição provocada pelo TBT e esta especificidade levou a que fosse utilizado em programas de monitorização.

¹ De acordo com a "Endocrine Society" um desregulador endócrino é um químico exógeno, ou uma mistura de substâncias químicas, que interfere com qualquer aspeto da ação hormonal (Zoeller et al., 2012).

A Comissão OSPAR² recomenda, por exemplo, a utilização do imposexo para monitorizar os níveis de poluição provocados por TBT (OSPAR, 2003) e adotou primeiramente *N. lapillus* para esse efeito. No entanto, devido à ausência deste gastrópode em algumas áreas costeiras, a OSPAR aconselha o uso de outras espécies, como por exemplo: *Nassarius reticulatus*, *Buccinum undatum*, *Neptunea antiqua* e *Littorina littorea* (OSPAR, 2003), uma vez que através destas espécies também é possível proceder à avaliação dos níveis de poluição por TBT.

Nassarius reticulatus

Nassarius reticulatus (Tabela I) é um gastrópode marinho, que pertence ao grupo dos prosobrânquios e que se distribui geograficamente desde as Canárias e Açores até ao Norte da Noruega, por todo o mar Negro e Mediterrâneo (Fretter e Graham, 1994).

Este gastrópode apresenta uma concha de alta espiral, com o vértice sempre ausente, possuindo uma ornamentação formada por numerosas costas e estrias que se cruzam e originam um padrão reticulado (Figura 3).

A abertura é pequena, com uma forma oval, e com um canal sifonal pequeno e oblíquo. Na parte exterior, o labro apresenta uma calosidade branca e na parte interior uma crista com 6 a 9 dentes. A altura máxima é aproximadamente 30 mm, e a largura é cerca de 14 mm (Figura 3). Na cabeça encontram-se 2 tentáculos, cada um dos quais com um olho, o pé é estreito e longo, e os animais são pretos e castanhos com pigmentação branca (Graham, 1988).

Habitam preferencialmente sedimentos vasosos, no entanto também podem aparecer em substrato rochoso e arenoso, são necrófagos e a sua longevidade pode atingir os 15 anos (Fretter e Graham, 1994; Barroso e Moreira, 1998). Como estes organismos se encontram em diversos substratos, incluindo os substratos vasosos, característicos de zonas portuárias, assim como em zonas intertidais

ou mais profundas da plataforma, esta espécie é muito utilizada para a monitorização da poluição por TBT.

O facto desta espécie tolerar uma vasta gama de salinidades, ter uma distribuição geográfica alargada e ser menos sensível que a espécie tradicionalmente usada (*N. lapillus*), permite a sua utilização para a monitorização de áreas moderadamente poluídas a muito poluídas. De acordo com a OSPAR, o objetivo de qualidade ecológica é atingido quando os níveis de imposexo nesta espécie, quantificados através do índice do VDS (ver material e métodos), são inferiores a 0,3 (OSPAR, 2007). No presente trabalho, este foi o organismo selecionado como espécie indicadora para avaliar os níveis de imposexo em duas zonas distintas da costa portuguesa: Aveiro e Viana do Castelo.

TABELA I: Classificação taxonómica de *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758).

Phylum	Mollusca
Classe	Gastropoda
Subclasse	Prosobranchia
Ordem	Neogastropoda
Superfamília	Buccinaceae
Família	Nassariidae
Género	<i>Nassarius</i>
Espécie	<i>Nassarius reticulatus</i>



FIGURA 3: Espécime adulto de *N. reticulatus*, com o padrão reticulado, a calosidade branca e os dentes do labro visíveis.

² Comissão OSPAR “Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic”, é uma convenção internacional, adotada em Paris no âmbito da reunião ministerial das comissões de Oslo e Paris, em Setembro de 1992, com o objetivo de monitorizar a saúde ambiental dos habitats marinhos e costeiros.

O principal objetivo deste trabalho é descrever a metodologia necessária para avaliar os níveis de imposex e, desta forma, fornecer as ferramentas necessárias para que este trabalho experimental possa ser realizado no âmbito do ensino experimental das ciências, particularmente ao nível da disciplina de Biologia no 12º ano.

METODOLOGIA

Amostragem

Foram selecionados dois locais na costa Noroeste de Portugal com diferentes níveis de contaminação, onde a abundância de *N. reticulatus* é elevada e a sua captura é fácil. As áreas de estudo escolhidas localizam-se na proximidade do Porto de Aveiro e de Viana do Castelo, ambos com um historial bem descrito de contaminação por TBT (Sousa et al., 2009a; Sousa et al., 2009b). Aproximadamente 100 organismos adultos foram colhidos nos portos de Aveiro (Magalhães Mira) e Viana do Castelo (Cais) (Figura 4).

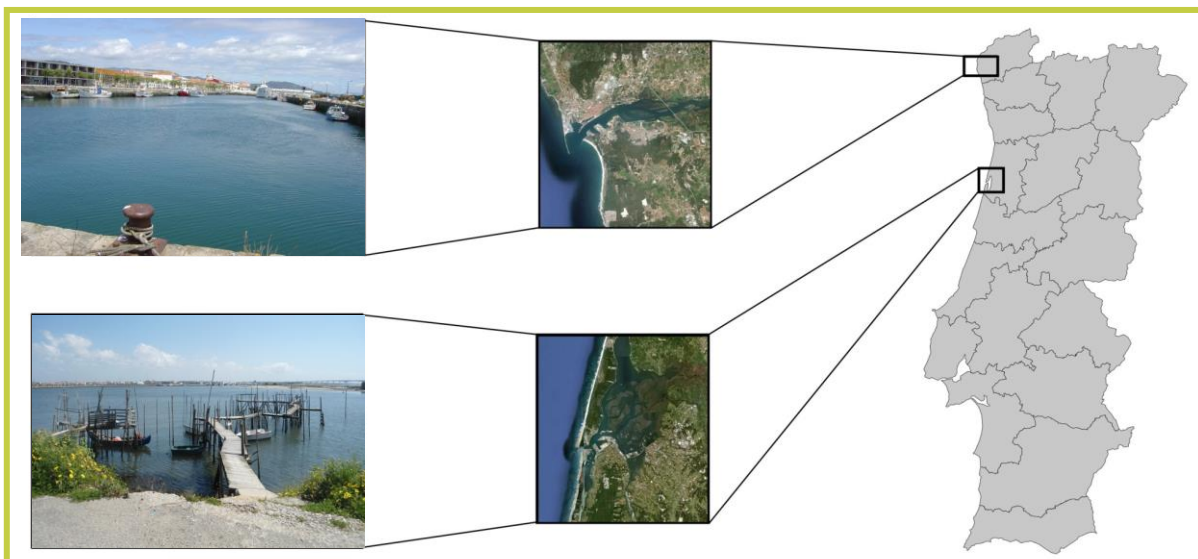


FIGURA 4: Mapa com a localização das áreas de estudo - Aveiro (40°38'34.65" N/8°44'06.80" W) e Viana do Castelo (41°41'15.73" N/8°50'20.50" W).

A recolha foi realizada com uma nassa com isco (Figura 5), no entanto em zonas pouco profundas (praias, por exemplo) estes organismos podem ser facilmente capturados à mão. Após a colheita, os organismos foram transportados para o laboratório, onde foram mantidos em água do local da colheita com arejamento constante.

Seleção e preparação de indivíduos

Foram selecionados exclusivamente indivíduos adultos, para isso, recorreu-se a duas características principais: a presença de calosidade branca (calo) e de dentes no labro (ver Figura 3). A altura dos animais foi medida com uma craveira (Figura 6a).

De seguida, os indivíduos foram anestesiados com cloreto de magnésio ($MgCl_2$ 70g.L⁻¹) durante aproximadamente 1 hora (Figura 6b). Após este período, as conchas foram partidas com um torno de bancada (Figura 6c).



FIGURA 5: Nassa com isco.

Com o auxílio de uma tesoura (ou pinça) foi cortado o músculo da columela e o animal foi removido gentilmente da concha com a ajuda de uma pinça. Esta operação deve ser realizada com cuidado de modo a não exercer demasiada pressão no indivíduo, evitando lesões nos tecidos.



FIGURA 6: Etapas para a preparação dos indivíduos. (a) Medição da altura da concha de *N. reticulatus* com uma craveira; (b) Anestesia do animal em cuvetes com cloreto de magnésio; (c) Quebra da concha com um torno de bancada.

Análise imposexo

A análise do imposexo foi realizada à lupa (ampliação 10x). Inicialmente foi identificado o sexo do animal, sendo que esta identificação é baseada na presença de uma vesícula seminal branca nos machos (Figura 7a) e de uma glândula da cápsula branca e um oviduto alaranjado nas fêmeas (Figura 7b). Após a determinação do sexo dos indivíduos vários parâmetros foram analisados:

- medição do tamanho do pênis em machos e em fêmeas. A medição é realizada com a ajuda de papel milimétrico (impermeabilizado com fita-cola) que é colocado sobre a base do pênis. O pênis deve estar completamente distendido ao longo do papel milimétrico (Figura 7c);
- avaliação da Sequência do Vaso Deferente (VDS), analisado exclusivamente nas fêmeas. Este parâmetro proposto por Stroben et al. (1992) e modificado por Barroso e Moreira (2002b), possui 5 estádios (Tabela II);
- presença de fêmeas estéreis. O protocolo aconselha que esse parâmetro deva ser medido pela existência de ovos abortados no interior da glândula ou bloqueio da vulva, ambas as características apontam para a esterilidade das fêmeas. A presença de fêmeas estéreis em *N. reticulatus* é rara, não sendo atualmente espectável.

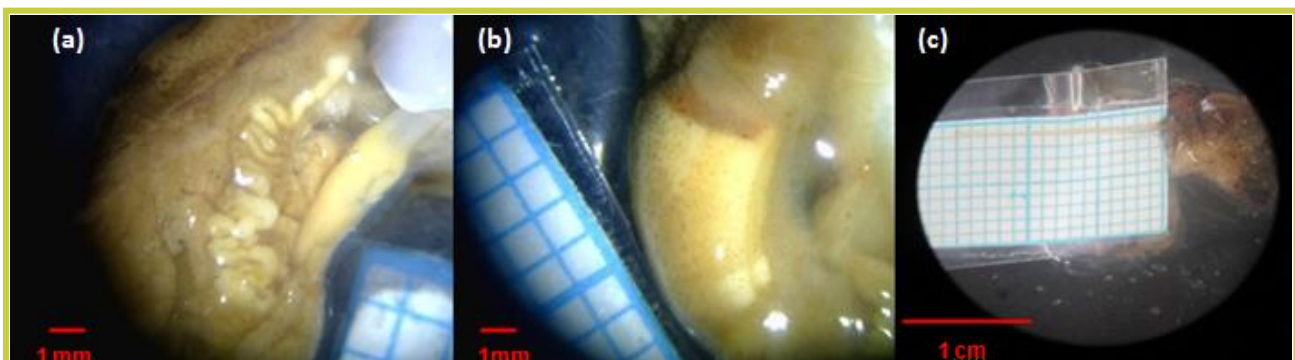
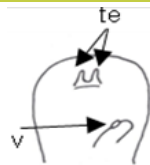









FIGURA 7: Identificação do sexo do animal. (a) Vesícula seminal branca nos machos; (b) Glândula da cápsula branca nas fêmeas; (c) Medição do pênis do animal com o auxílio de papel milimétrico impermeabilizado com fita-cola.

TABELA II: Esquema da evolução do imposexo em *N. reticulatus* com a descrição de cada um dos estádios de VDSI, apresentando as duas vias: via a: com aparecimento de pênis e via b: onde não ocorre desenvolvimento do pênis, de acordo com a classificação proposta por Stroben et al. (1992) e por Barroso et al. (2002). (*) Adaptado de OSPAR (2008). v: vulva, rd: rudimento de pênis, p: pênis, dp: ducto penial, vd: vaso deferente, te: tentáculo.

Estádio	Descrição	Esquema*
VDS 0	Fêmea não afetada; Sem rudimento de pênis; Sem vaso deferente.	
VDS 1a	Aparecimento de um pênis rudimentar (semelhante a uma "borbulha").	
VDS 1b	Ausência de pênis; Aparecimento do vaso deferente.	
VSD 2	Desenvolvimento de um ducto penial no interior do pênis; Ausência de vaso deferente.	
VSD 3a	Pênis com ducto, e desenvolvimento de vaso deferente.	
VSD 3b	Ausência de pênis; Continuação do desenvolvimento do vaso deferente.	
VSD 4	Vaso deferente prolonga-se até à zona da vulva.	
VSD 5	Vaso deferente bloqueia ou ultrapassa a vulva.	

Análise de dados

Os dados obtidos foram inseridos em folhas de cálculo do Microsoft Excel. Para cada uma das estações foram determinados os seguintes índices: FPLI: comprimento médio do pênis das fêmeas (mm); VDSI: índice da sequência do vaso deferente; MPLI: comprimento médio do pênis dos machos (mm); RPLI: comprimento relativo do pênis das fêmeas [(FPL/MPL) x 100]; e %I: incidência das fêmeas afetadas por imposexo na população (Nº de fêmeas com imposexo/Nº total de fêmeas x 100), assim como as médias e desvios padrões associados da altura das conchas das fêmeas e machos.

De forma a perceber se existiam diferenças significativas nos parâmetros de imposexo avaliados entre Aveiro e Viana do Castelo, nomeadamente o VDSI e FPLI, foi realizado o teste não paramétrico de Man-Whitney, uma vez que não se cumpriram os requisitos para a realização de um teste paramétrico (como por

exemplo um teste de t), nomeadamente no que diz respeito aos pressupostos da normalidade. O nível de significância adotado foi de $\alpha < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Níveis de imposexo em Aveiro e Viana do Castelo

Os resultados dos vários parâmetros de imposexo estudados assim como da altura média dos animais e número de animais observados encontram-se descritos na Tabela III. Na estação de Aveiro foram avaliados 46 animais, sendo que 22 eram machos e 24 fêmeas. A média da altura das conchas nas fêmeas foi de 26,7mm e a incidência que se verificou foi de 37% pelo que a maioria das fêmeas não tinham qualquer indício de imposexo, isto é, o seu VDSI era 0. A média do VDSI situou-se nos 0,4 com um valor máximo observado de 3 apresentado apenas por duas das fêmeas em estudo, onde o vaso deferente já se começava a desenvolver. Em concordância com estes resultados, a média do FPLI foi de 0,2 mm, sendo que apenas 5 das fêmeas apresentavam pénis. Quanto ao RPLI, este foi de 1,7% verificando-se assim que o pénis das fêmeas é bastante inferior ao pénis dos machos.

TABELA III: Níveis de imposexo registados nas duas áreas de estudo com indicação do número de machos (N°♂) e fêmeas (N°♀) com a respetiva altura das conchas (H) \pm desvio padrão; Comprimento do pénis dos machos (MPLI) \pm desvio padrão; Tamanho do pénis das fêmeas (FPLI) \pm desvio padrão; Índice do tamanho relativo do pénis das fêmeas (RPLI); Índice da sequência de vaso deferente (VDSI) e percentagem de fêmeas afetadas (%).

	N°♂	H♂(mm)	MPLI (mm)	N°♀	H♀(mm)	VDSI	FPLI (mm)	RPLI (%)	I (%)
Aveiro 2013	22	24,3 \pm 2,07	13,1 \pm 2,80	24	26,7 \pm 1,35	0,40 \pm 0,91	0,20 \pm 0,51	1,7	37
Viana 2013	44	23,6 \pm 2,22	8,40 \pm 2,80	24	24 \pm 2,75	3,90 \pm 0,83	6,60 \pm 1,95	78,1	100

Na estação de Viana do Castelo foram avaliados 68 animais, 44 machos e 24 fêmeas. Nesta estação, a média da altura das conchas nas fêmeas fixou-se nos 24,3 mm, já a média do VDSI foi de 3,9. É importante referir que o valor mais baixo de VDSI que se verificou nesta estação e para o presente ano foi de 3, e 7 das 24 fêmeas analisadas apresentaram um VDSI de 5, o que implica que o desenvolvimento do vaso deferente seja tal que ultrapasse a vulva. Numa das fêmeas, a proliferação do tecido do vaso deferente bloqueou a vulva tornando-a estéril. A média do FPLI foi de 6,6 mm, sendo que o valor mais alto que se registou para o comprimento do pénis nas fêmeas foi de 14 mm e apenas um macho registou um valor superior (15,5mm). O índice do RPLI foi de 78,1% e todas as fêmeas em estudo apresentavam imposexo, isto é, a incidência foi de 100%. Tal como facilmente se verifica através da análise da Figura 8, a realização do teste não paramétrico de Man-Whitney permitiu a observação de diferenças significativas entre as estações de Aveiro e Viana do Castelo, particularmente no VDSI e FPLI. Como seria expectável a estação de Aveiro apresenta valores significativamente inferiores ($p < 0,001$) à estação de Viana do Castelo, estes valores estão também de acordo com dados publicados por outros autores para anos anteriores (Rato et al., 2009; Sousa et al., 2009b).

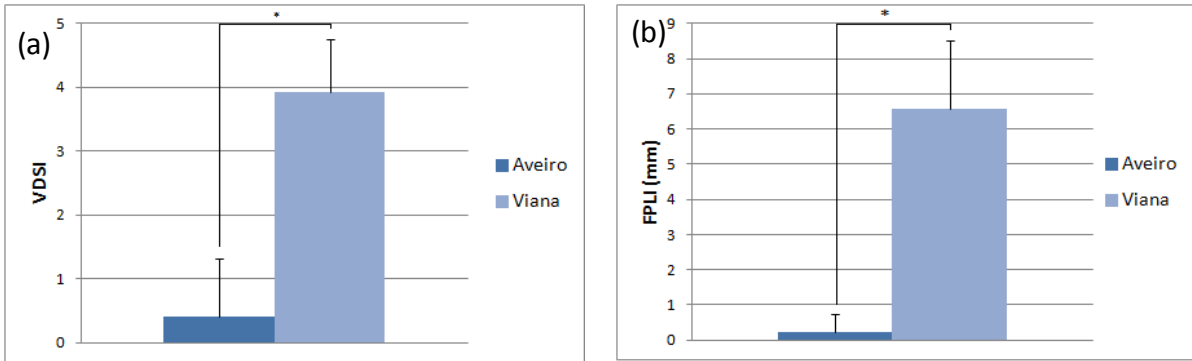


FIGURA 8: Variação do índice da sequência do vaso deferente (a) e do comprimento médio do pénis das fêmeas (b) nas estações de Aveiro e Viana, com o respetivo desvio padrão associado. As diferenças significativas estão assinaladas com * ($p < 0,001$).

Comparação com resultados descritos e avaliação da eficácia da legislação

Na evolução do VSDI (Figura 9a), podemos denotar que, na estação de Aveiro, e apesar do aumento de 2000 para 2003 (Sousa et al., 2005), tem vindo a registar-se uma diminuição progressiva chegando aos 0,4 no presente ano. O FPLI e o RPLI diminuíram em todas as campanhas realizadas (Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2009b) comprovando a evolução positiva que a estação teve desde 2003 até este ano. Já a estação de Viana do Castelo, apresenta uma melhoria do VSDI de 2003, ano da implantação da proibição europeia, até 2006 (Rato et al., 2009), descendo dos 4,9 até os 3,7 como se pode ver na figura 9b, a partir de 2006 e até ao recente estudo seguiu-se um período de estabilização, onde os parâmetros em estudo não variaram muito. O FPLI diminuiu de 2000 para 2003 (Sousa et al., 2005), não havendo no entanto, valores descritos para 2006, registando depois um aumento em 2008 (Sousa et al., 2009b) para uma nova diminuição no presente estudo, ainda assim para valores da ordem dos 6,6 mm. O RPLI diminuiu de 2000 até 2008 (Sousa et al., 2009b) aumentando para 78,1% neste estudo. Uma hipótese para os valores elevados apresentados na estação de Viana do Castelo é avançada no tópico seguinte.

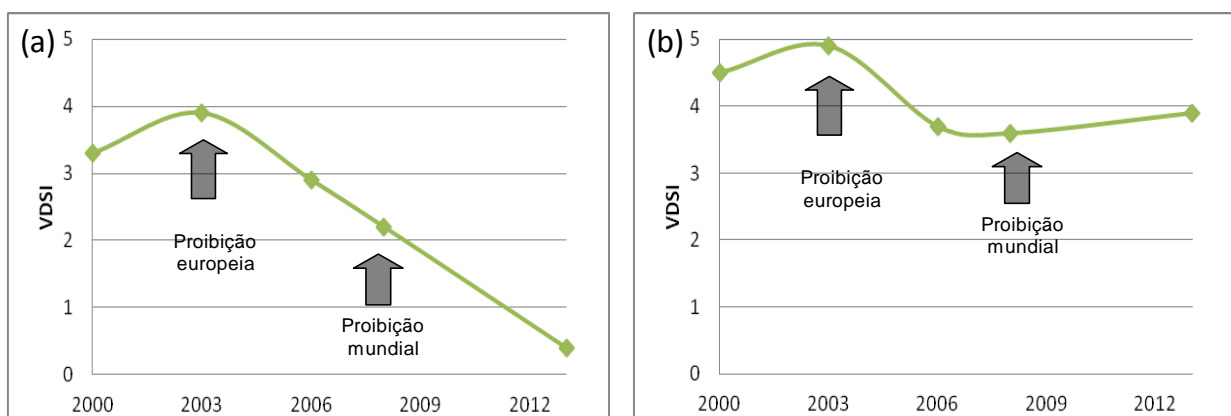


FIGURA 9: Evolução temporal do índice de VDS, ao longo dos anos de 2000, 2003, 2006, 2008 e 2013 em Aveiro (a) e Viana do Castelo (b). Dados extraídos de Sousa et al. (2005), Rato et al. (2009) e Sousa et al. (2009b).

Avaliação da eficácia da legislação

Como podemos observar pelos dados da campanha realizada em 2013, a estação de Aveiro, com um VDSI de 0,4 encontra-se bastante próxima do limiar traçado pela OSPAR para o VDSI ($VDSI < 0,3$), em contrapartida, a estação de Viana do Castelo encontra-se fortemente afetada pelo fenómeno do imposexo com um VDSI de 3,9. No gráfico referente ao tráfego marítimo (Figura 10) verifica-se que os valores quer em termos de número de embarcações, quer em termos de tonelagem bruta, são mais elevados no Porto de Aveiro, em comparação com Viana. No entanto o Porto de Viana do Castelo possui o maior estaleiro de construção naval de Portugal (www.envc.pt). Com a aproximação do limite legal para a proibição total do uso de tintas antivegetativas contendo TBT, houve a necessidade de recorrer aos estaleiros para as retirar.

Desta forma, e na ausência de um tratamento de resíduos eficaz, o TBT das antigas tintas antivegetativas migrou diretamente para o ambiente aquático (Kotrikla, 2009). Tendo o TBT a possibilidade de adsorver à matéria orgânica ele acaba por ser acumulado nos sedimentos que atuam como um reservatório deste contaminante. A libertação progressiva a partir dos sedimentos garante um input contínuo de TBT ao longo de várias décadas (Ruiz et al., 2008). Assim, a proximidade a estaleiros faz antever valores mais altos de imposexo tal como se verifica no presente trabalho.

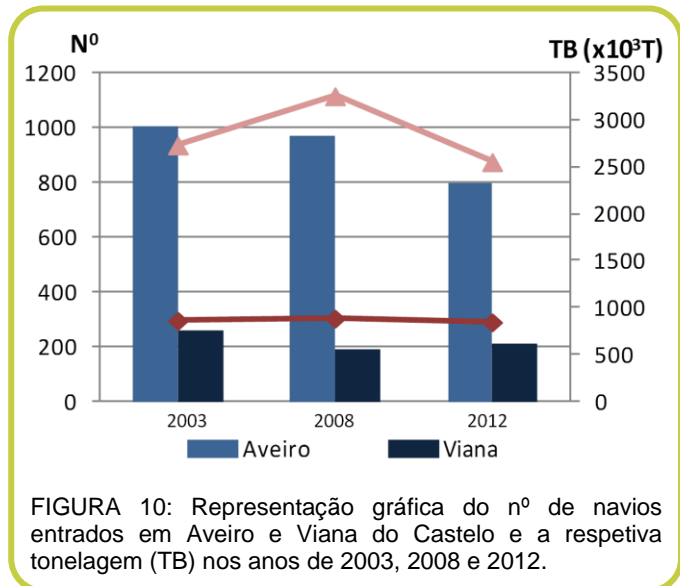


FIGURA 10: Representação gráfica do nº de navios entrados em Aveiro e Viana do Castelo e a respetiva tonelagem (TB) nos anos de 2003, 2008 e 2012.

CONCLUSÃO

Nenhuma das estações - Aveiro ou Viana do Castelo - cumpre o requisito da OSPAR para esta espécie, que fixa a média do VDSI num máximo de 0,3, valor acima do qual o objetivo de qualidade ecológica não é atingido. Ainda assim, a estação de Aveiro, com uma evolução positiva do fenómeno, encontra-se consideravelmente mais perto da meta do que a estação de Viana do Castelo. Isto significa que Aveiro está menos afetado pelo fenómeno do imposexo, e portando menos poluído por TBT do que Viana. Esta diferença pode estar relacionada com a presença de um grande estaleiro perto da estação de Viana do Castelo, local onde até 2008 as tintas antivegetativas que continham TBT deveriam ser retiradas de todas as embarcações, constituindo assim uma enorme fonte de contaminação. Neste contexto, é de extrema importância continuar a realizar campanhas de monitorização para avaliar os níveis de poluição por TBT nestas duas áreas de estudo, de modo a verificar se as metas propostas pela OSPAR são atingidas. É de realçar que a realização deste trabalho envolve uma metodologia simples, fácil de executar e de custo reduzido, o que permite a sua realização em qualquer escola, como um exemplo ímpar de um caso de estudo sobre disrupção endócrina.

agradecimentos • Os autores agradecem aos técnicos do Departamento de Biologia, Sr. Rui Marques e Sr. Aldiro Pereira, responsáveis pelas amostragens e manutenção dos organismos. Agradecemos também a Alfredo Veríssimo pela disponibilidade para a realização das ilustrações científicas das Figuras 1 e 2. Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PEst-C/MAR/LA0017/2013. Ana R. Barros e Rúben T. S. Mendes agradecem à Direção Geral do Ensino Superior financiadora da bolsa de estudo. Ana C.A. Sousa agradece à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento através da Bolsa de Pós-Doutoramento (SFRH/BPD/65884/2009) atribuída no âmbito do QREN - POPH - Tipologia 4.1 - Formação Avançada, participado pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel PD (2000). TBT: towards a better way to regulate pollutants. *The Science of the Total Environment* 258: 1-4.
- Alzieu C (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management* 40: 23-26.
- Alzieu C (2000). Environmental impact of TBT: the French experience. *The Science of the Total Environment* 258: 99-102.
- Barroso CM, Moreira MH (1998). Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78: 1233-1246.
- Barroso CM, Moreira MH (2002a). Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. *Marine Pollution Bulletin* 44: 480-486.
- Barroso CM, Moreira MH, Bebianno MJ (2002b). Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology-Progress Series* 230: 127-135.
- Blaber SJM (1970). The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 231-233.
- Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around the south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66: 611-640.
- Dowson PH, Bubb JM, Lester JN (1996). Persistence and Degradation Pathways of Tributyltin in Freshwater and Estuarine Sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 42: 551-562.
- Fretter V, Graham A (1994). British Prosobranch Molluscs, their Functional Anatomy and Ecology. The Ray Society, Dorset Press, Dorchester, 476-492 pp.
- Gibbs PE, Pascoe PL, Burt GR (1988). Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 68: 715-731.
- Goldberg ED (1986). TBT: an environmental dilemma. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 28: 17-44.
- Graham ID (1988). Molluscs: prosobranch and pyramidellid gastropods London: *The Linnean Society of London and the Brackish-Water Science Association* 186-189.
- Hoch M (2001). Organotin compounds in the environment — an overview. *Applied Geochemistry* 16: 719-743.
- IMO (1999). Anti-fouling systems moving towards the non-toxic solution. International Maritime Organization, United Kingdom, London. <http://www.imo.org/OurWork/Environment/Anti-foulingSystems/Documents/FOULING2003.pdf>
- Kotrikla A (2009). Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. *Journal of Environmental Management* 90: S77-S85.
- Marshall P, Christie C, Dobbs K, Green A, Haynes D, Brodie J, Michalek-Wagner K, Smith A, Storie J, Turak E (2002). Grounded ship leaves TBT-based antifoulant on the Great Barrier Reef: An overview of the environmental response. *Spill Science and Technology Bulletin* 7: 215-221.
- Matthiessen P, Gibbs PE (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 37-43.
- Negri AP, Hales LT, Battershill C, Wolff C, Webster NS (2004). TBT contamination identified in Antarctic marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 48: 1142-1144.
- Omae I (2003). Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry* 17: 81-105.

- OSPAR (2003). Joint Assessment and Monitoring Program – Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effects Monitoring: Technical annex 3 (TBT-specific biological effects monitoring). Ospamission, London. http://www.ospar.org/content/content.asp?menu=00900301400135_000000_000000.
- OSPAR (2007). EcoQO Handbook: Handbook for the application of Ecological Quality Objectives in the North Sea. Biodiversity Series. OSPAR Commission, 39 pp.
- OSPAR (2008). JAMP Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effects (OSPAR Agreement 2008-09). OSPAR Convention For the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic: Monitoring programs. 48 pp.
- Rato M, Ferreira N, Santos J, Barroso C (2009). Temporal evolution of imposex in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: the efficacy of EC regulation 782/2003. *Journal of Environmental Monitoring* 11: 100-107.
- Ruiz JM, Barreiro R, Couceiro L, Quintela M (2008). Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. *Chemosphere* 73: 1253-1257.
- Santillo D, Johnston P, Langston WJ (2001). 13. Tributyltin (TBT) antifoulants: a tale of ships, snails and imposex. Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896–2000. European Environment Agency, Copenhagen, 135-148 pp.
- Santos MM, ten Hallers-Tjables CC, Santos AM, Vieira N (2002). Imposex in *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *Journal of Sea Research* 48: 217-223.
- Shi HH, Huang CJ, Zhu SX, Yu XJ, Xie WY (2005). Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Marine Ecology-Progress Series* 304: 179-189.
- Smith BS (1971). Sexuality in the american mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 377-378.
- Smith BS (1981a). Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *Journal of Applied Toxicology* 1: 15-21.
- Smith BS (1981b). Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. *Journal of Applied Toxicology* 1: 22-25.
- Sousa A, Mendo S, Barroso C (2005). Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. *Applied organometallic chemistry* 19: 315-323.
- Sousa A, Ikemoto T, Takahashi S, Barroso C, Tanabe S (2009a). Distribution of synthetic organotins and total tin levels in *Mytilus galloprovincialis* along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1130-1136.
- Sousa A, Laranjeiro F, Takahashi S, Tanabe S, Barroso CM (2009b). Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* 77: 566-573.
- Sousa ACA, Pastorinho MR, Takahashi S, Tanabe S (2013). Organotin compounds: from snails to humans. In: E Lichtfouse, J Schwarzbauer, D Robert (Eds.), *Environmental Chemistry for a Sustainable World: Pollutant Diseases, Remediation and Recycling*. Springer, Switzerland, 4, 215-275 pp.
- Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P (1992). The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology* 113: 625-636.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ, Vom Saal FS (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153: 4097-4110.