



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2004

**Ana Catarina Almeida
Sousa Estudo do impacto da poluição por tributilestanho
(TBT) na Costa Portuguesa**



**Ana Catarina Almeida
Sousa Estudo do impacto da poluição por tributilestanho
(TBT) na Costa Portuguesa**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências das Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob a co-orientação científica da Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Cristina de Matos Ricardo da Costa
Professora Auxiliar da Universidade dos Açores

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Por certo, alguém mais sábio que eu já disse que os agradecimentos só são necessários para entes estranhos, porque as pessoas a quem realmente devemos agradecer são de tal forma importantes na nossa vida que fazem parte de nós... não obstante esta certeza inabalável gostaria de lembrar a essas pessoas que elas existem e o quanto importantes são para mim e o foram para a elaboração desta tese:

Em primeiro lugar ao meu orientador por ter acreditado em mim desde o primeiro momento, por tornar possível a realização de um sonho e sobretudo por ser capaz de dar aos seus discípulos asas para voar. Creio que este último traço de carácter, provavelmente o mais difícil de adquirir, é sem dúvida a razão pela qual a sua excelência como orientador se manifesta. Professor Miguez: por tudo um muito obrigada!

À minha co-orientadora um agradecimento muito especial pela sua enorme sapiência, pela sua capacidade de trabalho que nos faz ter vontade de trabalhar ainda mais, mas sobretudo por estar presente nos momentos mais difíceis e de ter sempre umas palavras e uns conselhos excelentes para nos dar.

A toda a equipe do LEME pelo excelente ambiente de trabalho.

À Susana Galante Oliveira pelo companheirismo, espírito de aventura (só contigo é que o facto de ficar presa numa ilha podia ser tão delicioso), dedicação e boa disposição (quem é que se levanta às 4h da manhã com um sorriso nos lábios?) mas sobretudo pela amizade incondicional que nos foi possível construir ao longo de um ano de exaustivo trabalho. Foi um prazer enorme conhecer-te, trabalhar contigo e sobretudo poder neste momento chamar-te minha amiga.

À minha querida Luciana Génio que por mera casualidade entrou na minha vida (um almoço na cantina, lembras-te?) mas que neste momento é uma peça fundamental nesta engrenagem chamada LEME (Laboratório de Ecologia Marinha e Estuarina). Sem ti Lu, sem a tua força, entreajuda, paciência e uma amizade constante estes dois últimos anos teriam certamente sido menos agradáveis.

À Catarina pela boa disposição contagiativa e ajuda nas saídas de campo, as tuas gargalhadas estridentes já me fazem falta! À Belucha pela tua forma de estar que torna a vida dos outros tão mais fácil! À Margarida, pelo companheirismo, pela disponibilidade permanente e pela tua força de vontade.

À Carla Domingues pelos sábios conselhos, pela ajuda preciosa no sub mundo do tratamento de dados, pela presença reconfortante nas longas noites de trabalho: pelas bolachas e pelo café ...

A toda a equipa do *Laboratório de Ecoloxia da Universidade da Coruña*, em especial ao Professor Doutor José Ruiz de la Rosa e ao Professor Doutor Rodolfo Barreiro, por me terem proporcionado nos últimos meses de redacção da tese um excelente ambiente de trabalho, pelo apoio constante e pela salutar troca de experiências.

À Doutora Maria Quintela, pelo apoio, pela força mas sobretudo pela intensa amizade. Por saber sempre o que dizer quando a força esmorece, por nos fazer acreditar que tudo é possível, e que a ciência é sobretudo uma intensa paixão e uma enorme partilha!

À Lúcia Couceiro por me fazer sentir em casa, por me dar vontade de trabalhar ainda mais e por me fazer acreditar que na ciência podemos sempre ir mais além...

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra não acreditaram na realização deste trabalho pois graças a elas continuei sempre a trabalhar mesmo quando as coisas pareciam difíceis, foram sem dúvida um grande estímulo...

Ao Ramiro por ter sido e continuar a ser a minha fonte de inspiração. “Sem Ti nada correria sem ti...”

À minha adorada irmã que desde muito pequena se revoltou contra o facto da irmã mais velha poder vir a ser cientista (“eles são todos malucos”) mas que dada a sua sensibilidade extrema mas sobretudo ao enorme amor que me devota soube sempre apoiar-me nos momentos mais difíceis e obrigar-me a seguir em frente quando a minha única vontade era desistir. Xana: muito, muito obrigada.

Aos meus pais por tudo aquilo que nem mil palavras podem exprimir, sem vocês, sem o vosso apoio incondicional, sem o vosso amor e carinho constantes nada disto seria possível...Este trabalho também é vosso. Obrigada do mais profundo de mim...

resumo

As tintas vegetativas com tributilestanho (TBT) são utilizadas desde a década de 60 para prevenir a bioincrustação nas superfícies imersas. Apesar de extremamente eficientes no combate à bioincrustação são também extremamente tóxicas para organismos não alvo pelo que várias medidas legislativas restringindo o seu uso foram implementadas em vários países, nomeadamente em Portugal.

Concentrações de TBT inferiores a 0.5 ng Sn L⁻¹ promovem imenso (desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos nas fêmeas) em várias espécies de gastrópodes prosobrânquios. O imenso é o melhor exemplo conhecido de disruptão endócrina provocada por um poluente sendo utilizado como biomarcador para monitorizar os níveis de poluição por TBT.

No presente trabalho avaliou-se a variação espacial e temporal da poluição por TBT na Costa Continental Portuguesa utilizando *Nassarius reticulatus* como espécie indicadora. A variação espacial foi estudada ao longo da linha de costa de Norte a Sul de Portugal e, também, da linha de costa em direcção ao largo, na região NW de Portugal.

Estudou-se também o impacto deste composto nas populações de *N. reticulatus* em fases distintas do seu ciclo de vida: fase larva e fase adulta. Para a fase larva estudou-se, com base em experiências laboratoriais, a toxicidade do TBT ao nível da mortalidade das larvas velígeras. Para a fase adulta estudaram-se os níveis de imenso exibidos pelas fêmeas ao longo da Costa Portuguesa e o seu efeito ao nível da esterilização das fêmeas.

O rastreio dos níveis de imenso e da contaminação por compostos organoestânicos em *N. reticulatus* foi efectuado entre Maio e Agosto de 2003. Foram determinados diversos índices de imenso - %I (percentagem de fêmeas afectadas), VDSI (sequência do vaso deferente), RPLI (comprimento relativo do pénis), AOS (grau de convolução do oviducto) e %STER (percentagem de fêmeas estéreis) - em 23 estações de amostragem e quantificadas as concentrações de organoestânicos nos tecidos das fêmeas em 10 estações de amostragem. Fêmeas estéreis foram encontradas em dois locais e níveis de VDSI > 5, AOS > 1 e %I = 100% foram diagnosticados em estações localizadas no interior ou na proximidade de portos, tendo estes sido identificados como os locais onde ocorrem os mais elevados níveis de poluição. Os níveis de imenso foram também avaliados em 172 estações localizadas no NW da plataforma continental Portuguesa entre Aveiro (40° 38.00 N) e o Porto (41° 09.00 N). Fêmeas com imenso foram encontradas em 42% das estações localizadas ao longo de toda a gama de latitudes e profundidades, indicando que a poluição por TBT se encontra dispersa em toda a área estudada.

Foi realizada uma análise da evolução temporal dos níveis de imposéxo e da contaminação por TBT dos tecidos de *N. reticulatus* entre 2000 e 2003 na Costa Portuguesa. Esta análise revelou uma tendência de manutenção dos níveis de poluição sugerindo uma ineficácia das medidas legislativas anteriormente introduzidas (Directiva 89/677/EEC). Sendo o ano de 2003 aquele a partir do qual foram abolidas as tintas com TBT, os valores obtidos no presente trabalho constituem uma base de referência fundamental para analisar a futura evolução da poluição por TBT em Portugal e avaliar a eficácia das novas medidas legislativas impostas pela Organização Marítima Internacional (IMO).

O efeito tóxico do tributilestanho nas larvas de *N. reticulatus* foi descrito pela primeira vez neste trabalho. Realizaram-se ensaios de toxicidade aguda com velígeras recém eclodidas para avaliar os efeitos do TBT na mortalidade larvar. Demonstrou-se que este composto tem um efeito letal para as larvas desta espécie mas os valores de LC₅₀, NOEC e LOEC obtidos são muito superiores às concentrações ambientais de TBT. Sugere-se que no futuro sejam realizados estudos de toxicidade para tempos de exposição superiores aos descritos nesta tese (> 96 h) e sejam avaliados os efeitos letais e sub-letais daquele composto nas larvas.

abstract

Tributyltin (TBT) based antifouling paints are used since the 60s to prevent biofouling. Although very effective in preventing biofouling they are extremely toxic to non-target organisms. Hence, several countries, namely Portugal, adopted measures to ban its usage.

TBT seawater concentrations below 0.5 ng Sn L⁻¹ induce imposex (superimposition of male characters onto prosobranch females) on several gastropods species. Imposex is undoubtedly the best-studied example of endocrine disruption among invertebrates, being, therefore, used as a biomarker of TBT pollution.

In the current work the spatial and temporal variation of TBT pollution in the Portuguese coast was assessed using the netted whelk *Nassarius reticulatus* as a bioindicator. The spatial variation was studied along the Portuguese Coast from North to South and from the coastline to the offshore, in the NW Portugal.

The impact of TBT on the different stages of the life cycle of *N. reticulatus* was also assessed. For larval stages laboratory experiments were performed in order to study the impact of this compound upon *N. reticulatus* veligers mortality. For adult stages it was analysed the degree of imposex and its possible impact on female sterilization.

A survey was conducted between May and August 2003 along the Portuguese coast and the levels of imposex and organotin body burden were determined. The percentage of females affected with imposex (%I), the relative penis length index (RPLI), the vas deferens sequence index (VDSI) and the degree of female oviduct convolution index (AOS) were used to assess the level of imposex at 23 sampling stations throughout the coast and organotin analysis in females tissues was performed in 10 of those stations. Sterile females were found in two stations and VDSI>5, AOS>1 and %I=100% were diagnosed in stations located inside or in the vicinity of harbours. Therefore, harbours were identified as hotspots of TBT pollution.

Imposex levels were also assessed at 172 sites located on the NW Portuguese continental shelf between Aveiro (40° 38.00 N) and Oporto (41° 09.00 N). Females affected with imposex were found in 42% of the sites along the entire range of latitudes and depths, which indicates that TBT pollution is widespread over the study area.

A temporal analysis of imposex levels and organotin body burdens between 2000 and 2003 was performed. The results indicate maintenance of TBT pollution levels suggesting the inefficacy of former legislation (EEC Directive 89/677). Since the beginning of 2003 TBT antifouling paints are no longer applied, therefore, the results from the present work constitute the baseline for further studies that aims to evaluate the effectiveness of the IMO ban.

The toxic effect of TBT upon *N. reticulatus* larvae was studied for the first time in the present work. Acute toxicological tests were performed with recently hatched veligers in order to evaluate the effects of TBT on larval mortality. This compound is toxic to *N. reticulatus* larvae although the values obtained for LC₅₀, NOEC and LOEC are notoriously higher than the TBT environmental levels.

**Estudo do impacto da poluição por tributilestanho (TBT) na
Costa Portuguesa**

Impact of tributyltin (TBT) pollution in the Portuguese Coast

Science tells us what we know, but what we can know is little, and if we forget how much we cannot know we become insensitive to many things of great importance. [...] Uncertainty, in the presence of vivid hopes and fears, is painful, but must be endured if we wish to live without the support of comforting fairy tales.

Bertrand Russell "A History of Western Philosophy"

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introdução.....	17
1.1. Introdução Geral.....	19
1.1.1. Tintas antivegetativas: necessidade e breve resenha histórica.....	19
1.1.2. Compostos organoestânicos.....	21
1.1.2.1. Caracterização e propriedades físico-químicas.....	21
1.1.2.2. Produção e utilizações.....	23
1.1.2.3. Biodisponibilidade e persistência.....	26
1.1.3. Toxicidade dos compostos organoestânicos: efeitos nos organismos.....	29
1.1.4. Legislação associada ao uso de TBT.....	30
1.1.5. Efeito do TBT nos gastrópodes: Imposexo.....	33
1.1.6. <i>Nassarius reticulatus</i> : breve caracterização.....	37
1.1.7. <i>Nassarius reticulatus</i> : utilização do impossex como biomarcador da poluição por TBT.....	40
1.1.8. Sistemas antivegetativos alternativos.....	43
1.2. Objectivos gerais.....	46
Referências.....	47
CAPÍTULO 2: Imposex and organotin contamination in <i>Nassarius reticulatus</i> (L.) along the Portuguese Coast.....	55
2.1. Introduction.....	58
2.2. Methods.....	59
2.2.1. Sampling.....	59
2.2.2. Biological examinations.....	60
2.2.3. Organotin analysis.....	60
2.2.4. Statistical analysis.....	60
2.3. Results.....	63
2.3.1. Imposex and organotin body burden in <i>Nassarius reticulatus</i>	63
2.3.2. Spatial variation of impossex and organotin body burden.....	65
2.3.2. Temporal variation of impossex and organotin body burden.....	66
2.4. Discussion.....	70
References.....	73

CAPÍTULO 3: Assessment of tributyltin (TBT) pollution in the NW Portuguese continental shelf using <i>Nassarius reticulatus</i> (L.) as a bioindicator.....	77
3.1. Introduction.....	79
3.2. Materials and Methods.....	81
3.3. Results.....	83
3.3.1. <i>Nassarius reticulatus</i> distribution.....	83
3.3.2. <i>Nassarius reticulatus</i> imposex.....	83
3.4. Discussion.....	86
References.....	89
CAPÍTULO 4: Acute toxicity of tributyltin (TBT) to veliger larvae of <i>Nassarius reticulatus</i> (L.)	91
4.1. Introduction.....	93
4.2. Methods.....	97
4.2.1. Bioassay procedure.....	97
4.2.2. Test solutions.....	97
4.2.3. Statistical analysis.....	98
4.3. Results.....	99
4.4. Discussion.....	101
References.....	102
CAPÍTULO 5: Discussão.....	107
5.1. Discussão.....	108
5.2. Considerações finais.....	112
Referências.....	113

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1.1. Introdução geral

1.1.1. Tintas antivegetativas: necessidade e breve resenha histórica

A bioincrustação (tradução do original inglês *biofouling*) consiste no assentamento e crescimento de uma grande diversidade de organismos marinhos em estruturas perene ou temporariamente imersas em água, como cascos de navios, bóias e equipamentos de navegação, exutores submarinos, tubagens de arrefecimento de centrais termoeléctricas ou equipamento de aquacultura (Champ & Seligman, 1996; Omae, 2003a). Este fenómeno ocorre em duas etapas distintas: a bioincrustação primária que começa no exacto momento em que a superfície é submersa, sendo essencialmente constituída por uma comunidade complexa de bactérias, protozoários, diatomáceas e esporos de outras algas; e a bioincrustação secundária, caracterizada pela presença de organismos mais complexos, como cracas, algas em estágio adulto, hidróides, moluscos e esponjas [Fig 1.1] (Omae, 2003a).

A bioincrustação gera onerosos problemas à indústria naval, uma vez que aumenta a rugosidade do casco, aumentando o atrito - com uma consequente diminuição da velocidade e aumento do consumo de combustível - e em simultâneo acelera a corrosão do casco. Estima-se que um navio no mar durante meio ano necessita aumentar o consumo de combustível em cerca de 40% para manter a mesma velocidade, podendo acumular cerca de 150 Kg m⁻² de organismos incrustantes durante esse período de tempo (IMO, 1999).



Figura 1.1. Fotografia exemplificativa do fenómeno de bioincrustação no casco do navio “Snabmar” após uma viagem de 6 meses em alto mar. Porto de Pesca Longínqua, Aveiro, Portugal.

Os fenícios devem ter sido dos primeiros povos a tentar activamente controlar este fenómeno ao utilizarem nos seus barcos lâminas de cobre. Por volta de 2000 AC os cascos eram inteiramente revestidos com chumbo e pontas de cobre e cerca de 300 AC as primeiras camadas de cera com arsenatos e sulfatos foram desenvolvidas e aplicadas. Só em finais do século XIX é que o uso das tintas antivegetativas se industrializou e apareceram então resinas impregnadas com sulfato de cobre (Champ & Seligman, 1996; Omae, 2003a). Até à década de 60 do século XX o cobre continuou a ser utilizado, mas sob a forma de óxido. Desde essa altura e até tempos recentes o controlo da bioincrustação tem sido assumido pelos compostos organoestânicos (apesar de serem patenteados desde 1925 como agentes antitraças). Esta viragem resultou de um estudo sistemático conduzido na década de 50 pelo Conselho Internacional de Pesquisa sobre Tintas, no Instituto de Química Orgânica em Utrecht (van der Kerk and Luitjen, 1954 *in* Hoch, 2001), no qual se verificou a grande capacidade biocida dos derivados orgânicos do estanho (Godoi *et al.*, 2003; Hoch, 2001; Omae, 2003a). A sua comercialização começou na década seguinte e embora se encontrassem disponíveis no mercado várias alternativas a sua extrema eficácia no combate à bioincrustação tornou estes compostos, particularmente o tributilestanho (TBT), no biocida mais utilizado em todo o mundo (Bennet, 1996). Mesmo do ponto de vista ambiental, os compostos organoestânicos foram inicialmente considerados antivegetativos ideais dada a sua fácil degradação pela luz UV e pelos microorganismos (Omae, 2003a).

No entanto, no início da década de 80 surgiu em França o primeiro relato dos efeitos deletérios do TBT em organismos não alvo e desde então vários estudos apontaram para a extrema toxicidade deste composto no ambiente marinho (Alzieu, 1998). O TBT foi mesmo considerado como o composto mais tóxico alguma vez deliberadamente introduzido no meio aquático (Goldberg, 1986). Devido à sua elevada toxicidade para uma grande variedade de espécies marinhas, a utilização do TBT foi regulamentada em vários países ao longo das duas últimas décadas. A ineficácia das medidas introduzidas levou, porém, à proibição da aplicação de tintas com TBT em todo o tipo de embarcações a partir de 1 de Janeiro de 2003, tendo até Janeiro de 2008 que ser removidas ou seladas dos cascos das embarcações (IMO, 1999).

No entanto, as tintas antivegetativas são de uma importância extrema porque não só reduzem o consumo de combustível, que por sua vez reduz as emissões de dióxido de carbono e de enxofre para a atmosfera, mas também porque reduzem o risco de introdução de novas espécies (espécies exóticas) nos ecossistemas (Omae, 2003a; Abel, 2000).

Com a proibição do TBT mais um desafio é colocado à comunidade científica e à indústria de tintas: a procura de um sistema substituinte que cumpra tanto critérios ecológicos como económicos, garantindo simultaneamente elevados níveis de eficácia.

1.1.2. Compostos organoestânicos

1.1.2.1. Caracterização e propriedades físico-químicas

Os compostos organoestânicos caracterizam-se pela presença de um átomo de estanho (Sn) covalentemente ligado a um ou mais substituintes orgânicos (e.g. metil, etil, propil, butil, fenil). Quimicamente estes compostos são representados pelas fórmulas $RSnX_3$, R_2SnX_2 , R_3SnX , R_4Sn , na qual R é o grupo alquil ou arilo substituinte e X é a espécie aniónica como por exemplo haleto, óxido, hidróxido, cloreto ou fluoreto.

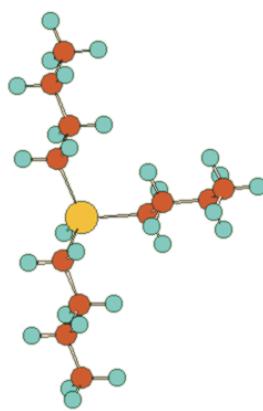


Figura 1.2. Modelo tridimensional da molécula de TBT. A esfera central amarela representa o átomo de estanho, as esferas vermelhas os átomos de carbono dos grupos butilo e as azuis os átomos de hidrogénio, cortesia da Doutora Maria Quintela.

As ligações Sn-C são estáveis na presença de água ou oxigénio atmosférico. São também estáveis a temperaturas até 200°C, pelo que a decomposição térmica não é significativa. O número de ligações Sn-C e o comprimento das cadeias alquilo tem efeitos nas propriedades químicas e físicas dos compostos organoestânicos (IPCS, 1990).

O estanho inorgânico não é tóxico, no entanto os seus derivados orgânicos possuem padrões toxicológicos muito complexos. Os efeitos biológicos dependem da natureza e do número de grupos orgânicos associados ao átomo de estanho. Normalmente, a actividade toxicológica máxima regista-se para compostos trisubstituídos da forma R_3SnX , como o TBT. A natureza do grupo X tem pouco ou nenhum efeito na sua actividade biocida, exceptuando os casos em que o próprio grupo X é um composto tóxico. Nestes casos as propriedades biocidas do organoestânico podem ser potenciadas (Hoch, 2001; IPCS, 1990).

O coeficiente de partição entre a fase particulada e aquosa ($K_p = C_{\text{sed}}/C_{\text{água}}$) varia normalmente entre 1000 e 3000 dependendo da natureza das partículas. Em solução aquosa a forma iônica TBT^+ encontra-se em equilíbrio com as formas TBTOH e $TBTCl$. No ambiente marinho em condições normais de pH e salinidade o TBT encontra-se sobretudo na forma TBTOH. A especiação química é relevante no meio aquático uma vez que a biodisponibilidade do TBT aumenta quando se encontra na forma TBTOH ($pH > 8$) (Alzieu, 1998; Fent, 1996).

1.1.2.2. Produção e utilizações

Os compostos organoestânicos têm um vasto leque de aplicações na agricultura e indústria [Tabela 1.1]. Cerca de 70% da produção total de compostos organoestânicos é utilizada na estabilização de PVC sendo utilizados os compostos mono e disubstituídos. Os compostos trisubstituídos têm propriedades biocidas e representam cerca de 15 a 20% da produção total (aproximadamente 5000 toneladas/ano). O trifenilestanho (TPT) é utilizado na agricultura e em menor escala nas tintas antivegetativas às quais é adicionado numa pequena percentagem (<10%). O tributilestanho (TBT) é essencialmente utilizado como biocida nas tintas antivegetativas ou na preservação de madeira (Bennet, 1996; Hoch, 2001).

Tabela 1.1. Utilizações industriais dos compostos organoestânicos, adaptado de Hoch (2001). R: grupo substituinte associado ao átomo de estanho, pode ser grupo metilo (Me), etilo (Et), butilo (Bu), fenilo (Ph) ou octilo (Oct); X: espécie aniónica.

Aplicação	Função	Composto
Estabilizadores PVC	Estabilização contra a degradação por luz e calor	$RSnX_3$ e R_2SnX_2 , $R=$ Me, Bu, Oct
Tintas antivegetativas	Biocida	R_3SnX $R=$ Bu e Ph
Agro-químicos	Fungicida, insecticida, acaricida	R_3SnX $R=$ Bu, Ph
Preservação madeira	Insecticida e fungicida	$Bu_3 SnX$
Tratamento vidro	Percursor da película de óxido de estanho (IV) nos vidros	$Me_2 SnX_2$, $RSnX_3$ $R=$ Me, Bu,
Materiais de protecção (pedras, couros e papel)	Fungicida, algicida, bactericida	$Bu_3 SnX$
Impregnação têxtil	Insecticida	Ph_3SnX
Avicultura	Desparasitante	$Bu_2 SnX_2$

As tintas antivegetativas consistem numa matriz que contém ingredientes biocidas e pigmentos. O seu modo de acção caracteriza-se pela libertação de pequenas quantidades de biocida para a água, formando uma capa que repele os

organismos incrustantes. Existem diferentes tipos de tintas que são classificadas consoante o seu modo de acção (Bennet, 1996; Hoch, 2001).

Tintas de associação livre:

Foram as primeiras a ser introduzidas no mercado. A matriz incorpora elevadas quantidades de TBT. Existem dois subtipos distintos consoante o tipo de matriz em que o TBT se encontra (Bennet, 1996).

Tintas de lixiviação por contacto:

Incorporam quantidades elevadas de TBT dentro de uma matriz insolúvel. A taxa de libertação inicial de TBT é elevada e controlada através de microcanais a partir do interior da matriz. Com o decorrer do tempo os poros são obstruídos por carbonatos ocorrendo uma diminuição exponencial da libertação (Bennet, 1996) [Fig 1.3]. Estas tintas têm uma durabilidade máxima de 2 anos e as embarcações não podem ser repintadas sem a remoção da camada anterior de tinta o que implica uma fonte adicional de poluição a partir dos estaleiros (de Mora, 1996).

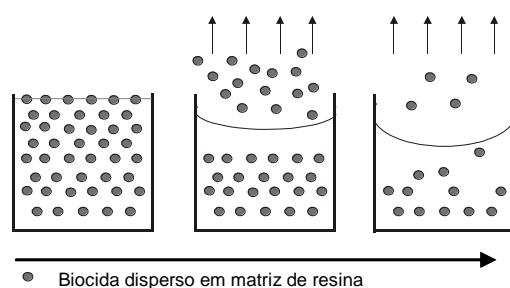


Figura 1.3. Modo de actuação das tintas de lixiviação por contacto, adaptado de Bennet (1996).

Tintas ablativas em matriz solúvel:

Incorporam o TBT numa matriz debilmente solúvel a partir da qual o TBT se libera por difusão. Periodicamente a camada superficial sem TBT separa-se deixando uma nova camada em contacto com a água, reiniciando a acção do

biocida; estas tintas possuem uma eficácia errática e durabilidade de alguns anos (Bennet, 1996) [Fig 1.4].

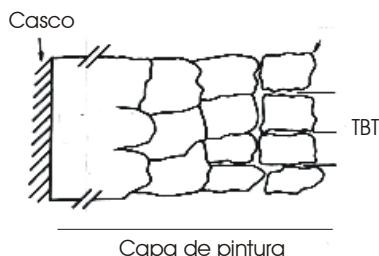


Figura 1.4. Modo de actuação das tintas ablativas em matriz solúvel, adaptado de Bennet (1996).

Copolímeros de autopolimento (SPC, Self Polishing Copolymer):

São tintas insolúveis em que a água não penetra na matriz na qual o TBT está copolimerizado, retardando a sua libertação para o ambiente aquático [Fig 1.5]. Contêm menores quantidades de biocida que as anteriores e podem ser potenciadas com a adição de compostos como o cobre (de Mora, 1996). A libertação do TBT da superfície da tinta é provocada por uma reacção química com a água do mar que hidrolisa a união entre a resina e o TBT de tal modo que o TBTO (óxido de tributilestanho) é libertado lentamente a uma velocidade controlada durante toda a vida da pintura. A hidrólise promove a erosão da superfície que permanece polida diminuindo assim o atrito e aumentando a performance do navio (Bennet, 1996). Estas tintas podem atingir uma durabilidade máxima de 60 meses (IMO, 1999), não necessitando de ser removidas aquando da repintura. Desde a sua aparição em 1978 que conquistaram um lugar cimeiro na indústria naval; em 1991, cerca de 80% dos barcos de tonelagem superior a 4000 T usava este tipo de tintas (IMO, 1999).

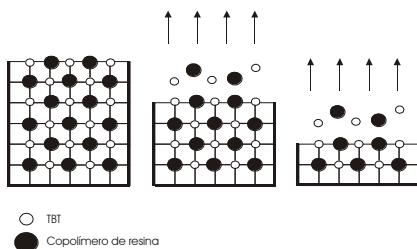


Figura 1.5. Modo de actuação dos copolímeros autopoliomerizantes, adaptado de Bennet (1996).

1.1.2.3 Biodisponibilidade e persistência

A persistência dos compostos organoestânicos no ambiente é regulada pelos processos de degradação. O processo básico de degradação do TBT consiste na perda progressiva dos grupos butilo ligados ao átomo de estanho originando os seus derivados dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT) [Fig 1.6]. A remoção dos grupos orgânicos pode ser provocada pela radiação ultravioleta, ou por processos biológicos ou químicos. A degradação biológica é promovida principalmente por microalgas e bactérias enquanto que a degradação química pode ser provocada por alguns ácidos e alquilmetais (Gadd, 2000; Hoch, 2001).

A biodisponibilidade dos compostos organoestânicos a partir da água depende essencialmente de dois parâmetros: o pH e a concentração de matéria orgânica dissolvida. A biodisponibilidade é elevada a pH neutro ou ligeiramente básico e reduzida na presença de matéria orgânica (Sarradin *et al.*, 1995; Fent, 1996). A bioacumulação nos organismos deve-se ao facto do TBT ser lipofílico; factores de bioconcentração superiores a 7000 foram descritos para algumas espécies de moluscos e peixes em experiências laboratoriais. No entanto, valores mais elevados foram descritos em organismos obtidos *in situ* (IPCS, 1990).

Diversos organismos na base da cadeia trófica têm capacidade de acumular TBT a partir da água sendo o tóxico transferido para os consumidores e predadores superiores, nomeadamente mamíferos e aves marinhas (Iwata *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1999; Tanabe *et al.*, 1998), conduzindo a uma acumulação ao longo da cadeia alimentar (Mamelona & Pelletier, 2003). Daqui se depreende

que para os organismos superiores a acumulação ocorre preferencialmente através da dieta, sendo pouco significativa a acumulação a partir da água (IPCS, 1990; Alzieu, 1998).

A acumulação ao longo da cadeia alimentar pode ser influenciada pela capacidade que alguns organismos, nomeadamente bactérias, algas, crustáceos e peixes, têm de degradar o TBT em DBT e MBT. No entanto, os mecanismos de destoxificação promovidos por estes organismos podem ser inibidos a elevadas concentrações ambientais de TBT (Alzieu, 1996; Laughlin, 1996 *in Champ & Seligman, 1996*).

A acumulação destes compostos ao longo da cadeia alimentar pode ter impactos sobre o homem através da ingestão de peixe e marisco contaminado (Chien *et al*, 2002.). Vários estudos revelaram a existência de TBT, DBT e MBT em amostras de sangue e fígado humanos (Kannan & Falandysz, 1997; Takahashi *et al.*, 1999; Kannan *et al.*, 1999). Segundo a Organização Mundial de Saúde a dose diária máxima de TBT ingerido não deve ultrapassar as 205 ng Sn kg⁻¹ dia⁻¹ (IPCS, 1990).

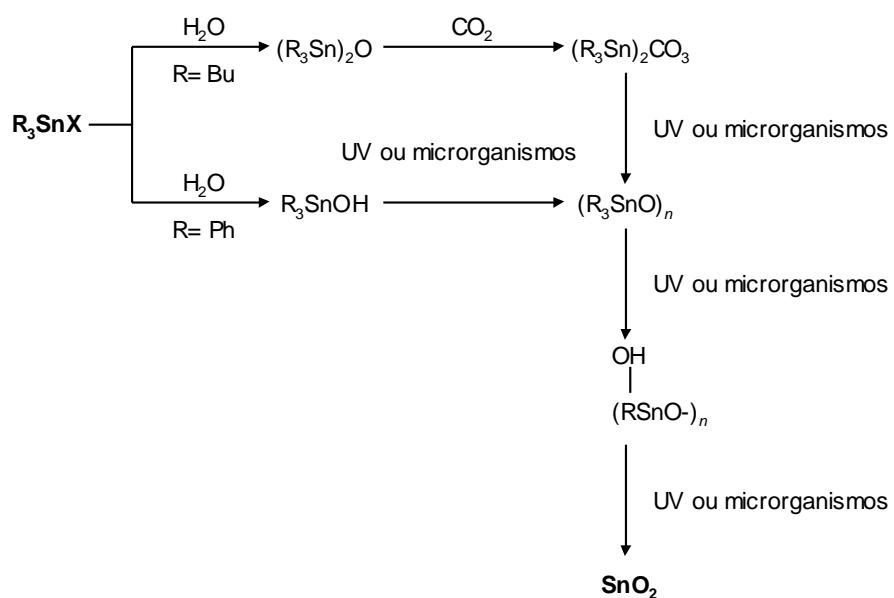


Figura 1.6. Esquema de degradação ambiental do TBT e do TPT, adaptado de Omae (2003a). R: grupo substituinte associado ao átomo de estanho, pode ser grupo butilo (Bu) ou fenilo (ph), X: espécie aniónica; UV: radiação ultravioleta.

O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) do TBT na água varia de alguns dias a algumas semanas e depende de vários parâmetros ambientais nomeadamente pH, temperatura, turbidez e luminosidade (Alzieu, 1996; Fent, 1996). Em águas estuarinas o $T_{1/2}$ é aproximadamente 6-7 dias a 28°C; nas águas oceânicas o $T_{1/2}$ aumenta para 17 dias à mesma temperatura (Batley, 1996). Os processos de degradação do TBT em sedimentos são mais lentos e o $T_{1/2}$ pode variar entre 1.9 e 3.8 anos nos sedimentos profundos (Batley, 1996), de tal forma que os sedimentos foram apontados como o maior reservatório ambiental de TBT no ambiente marinho e estuarino.

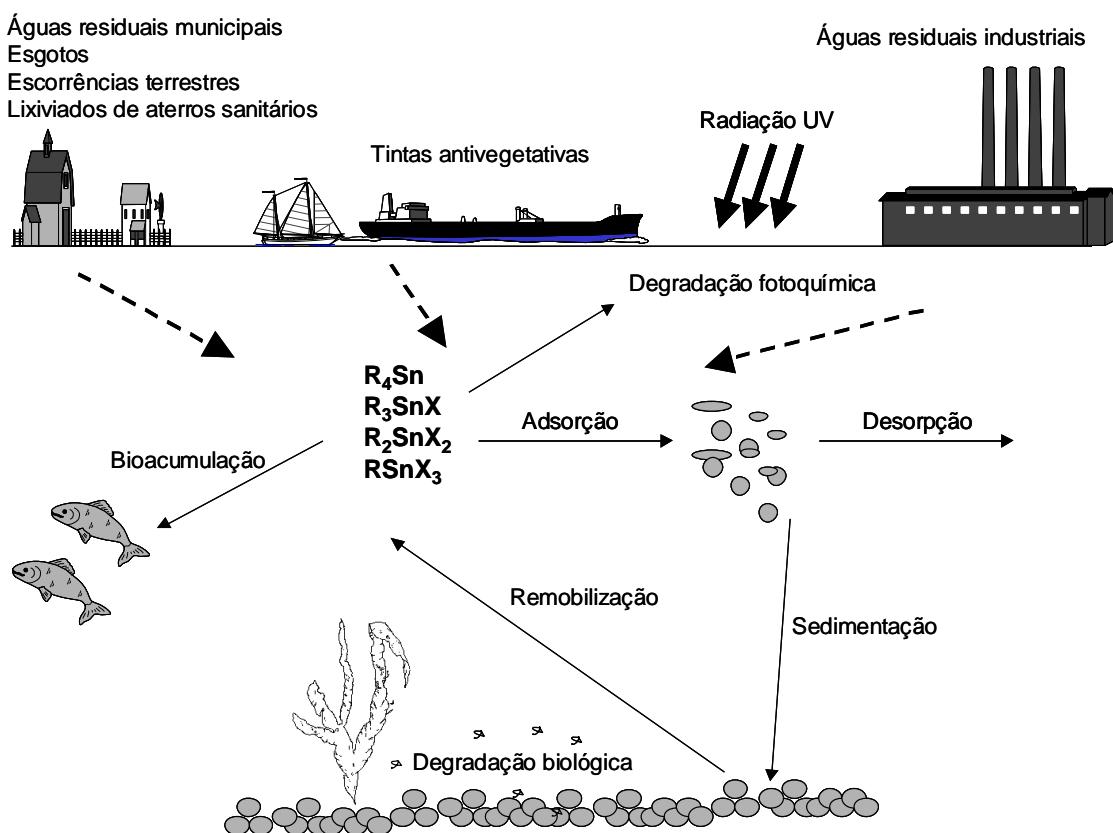


Figura 1.7. Distribuição, compartimentação, principais vias de incorporação e eliminação dos compostos organoestânicos no ambiente aquático, adaptado de Hoch (2001). R: grupo substituinte associado ao átomo de estanho, pode ser grupo metilo, etilo, butilo ou fenilo, X: espécie aniónica. As setas a tracejado representam as emissões de compostos organoestânicos para o ambiente aquático.

1.1.3. Toxicidade dos compostos organoestânicos: efeitos nos organismos

Os compostos organoestânicos, e em particular o TBT, provocam uma enorme variedade de efeitos (desde sub-letais a letais) em diversos organismos (desde bactérias até aos mamíferos) e nos mais distintos níveis organizacionais (do bioquímico ao populacional).

A primeira evidência de efeitos nefastos provocados pelo TBT em espécies não alvo surgiu na década de 70 em França onde se registaram efeitos deletérios em ostras com graves prejuízos económicos. Verificou-se que as conchas de *Crassostrea gigas* sofriam espessamento com a consequente diminuição do volume da parte comestível, diminuindo o seu valor comercial. A publicação de Alzieu *et al.* (1981) teve um enorme impacto público e político. Estes autores relacionaram o colapso na produção de ostras na Baía de Arcachon com o TBT libertado pelas tintas antivegetativas. Nesta baía um intenso tráfego de embarcações de recreio (10000 a 15000 barcos no Verão) coexistia com a cultura de *C. gigas* (Alzieu, 1998). No entanto, a hipótese de que o TBT era o causador de tais anomalias era ainda encarada com algum scepticismo. Mais tarde, esta evidência foi confirmada com a publicação de outros trabalhos científicos realizados noutras locais geográficos, como o Reino Unido (Thain & Waldock, 1976), EUA (Stephenson *et al.*, 1986), Japão (Okoshi *et al.*, 1987) e Austrália (Batley *et al.*, 1989).

Outros efeitos foram sendo relatados como por exemplo a ocorrência de características sexuais masculinas em fêmeas de gastrópodes. Este fenómeno foi designado por imosexo (Smith, 1971) e posteriormente relacionado com a presença de TBT (Smith, 1980, 1981a, 1981b) [ver secção 1.1.4].

Nos últimos anos, o estudo dos efeitos tóxicos do TBT tem merecido um grande relevo. Investigações sobre os efeitos a nível bioquímico e molecular sugerem que este composto: (i) estimula a actividade da adenosina trifosfato (ATP) inibindo a sua transformação em adenosina difosfato (ADP), provocando deformações na membrana mitocondrial (Fent, 1996); (ii) é um inibidor do citocromo P450 (Fent & Stegeman, 1991; Bettin *et al.*, 1996); (iii) afecta a homeostasia do cálcio intracelular (Marin *et al.*, 2000; Orrenius *et al.*, 1989, 1992;

Chow *et al.*, 1992); (iv) inibe as bombas iónicas, como a ATPase Na⁺/K⁺ e a ATPase dependente do Ca⁺² (Pinkney *et al.*, 1989; Cameron *et al.*, 1991 ; Selwyn *et al.*, 1978); (v) afecta a integridade da membrana celular (Hartl *et al.*, 2001; Sarapuk *et al.*, 2000; Raffray & Cohen, 1991; Zucker *et al.*, 1988); (vi) aumenta as concentrações das proteínas hsp 60 e hsp 70 nos tecidos de *Dreissena polymorpha* (Clayton *et al.*, 2000), entre outros.

Foi ainda demonstrado que o TBT induz a apoptose em timócitos de rato (Raffray & Cohen, 1991; Aw *et al.*, 1990) e de tunicatos (Cima & Ballarin, 1999); diminui a mobilidade dos espermatozóides de peixes (Rurangwa *et al.*, 2002); tem propriedades genotóxicas e citotóxicas em embriões e larvas de *Mytilus edulis* e *Platynereis dumerilli* (Jha *et al.*, 2000; Hagger *et al.*, 2002); tem efeitos imunotóxicos em hemócitos de bivalves, reduzindo a fagocitose (Bouchard *et al.*, 1999); entre muitos outros.

Ao longo das últimas décadas vários estudos relativamente aos efeitos letais e subletais têm sido realizados para inúmeros organismos em várias fases do seu ciclo de vida. Os organismos mais sensíveis são, de uma forma geral, os organismos planctónicos e os moluscos. Uma extensa revisão bibliográfica pode ser encontrada em Alzieu (1996) e IPCS (1990).

1.1.4. Legislação associada ao uso de TBT

As primeiras regulamentações no uso de TBT como biocida nas tintas antivegetativas foram adoptadas pelo Ministério Francês do Ambiente em 19 de Janeiro de 1982 em consequência do declínio na produção de ostras na Baía de Arcachon. Vários governos de outros países adoptaram medidas internas após a divulgação dos efeitos nefastos deste composto nas populações de bivalves e gastrópodes, nomeadamente o declínio das populações do gastrópode prosobrânquio *Nucella lapillus* em Inglaterra. Uma revisão das medidas legislativas adoptadas pelos vários países é resumida na tabela 1.2.

Tabela 1.2. Medidas legislativas impostas por vários países relativamente ao uso de TBT como biocida nas tintas antivegetativas, adaptado de Alzieu (1998).

País	Ano	Medida Legislativa
França	1982	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m;
Reino Unido	1986	Proibição da comercialização de tintas com mais de 7.5% de organoestânicos copolimerizados ou mais de 2.5% de organoestânicos livres;
Reino Unido	1987	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m e no material de aquacultura
Estados Unidos	1988	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m; Proibição do uso de tintas antivegetativas com uma taxa de lixiviação do TBT superior a $1,6 \mu\text{g Sn L}^{-1}\text{dia}^{-1}$;
Austrália	1988	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m;
Canadá	1989	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m;
Nova Zelândia	1993	Proibição do uso doméstico das tintas com TBT
Portugal	1993	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m; Proibição do uso de tintas antivegetativas com uma taxa de lixiviação do TBT superior a $1,6 \mu\text{g Sn L}^{-1}\text{dia}^{-1}$.

Na sequência das evidências científicas adquiridas ao longo dos anos que confirmaram a toxicidade dos compostos organoestânicos, particularmente do TBT, e seus efeitos nefastos para o ambiente costeiro, a Comunidade Europeia adoptou uma medida de regulamentação do uso de tintas com TBT proibindo a sua aplicação em embarcações com menos de 25m de comprimento e proibindo a utilização de tintas com uma taxa de lixiviação de TBT superior a $1,6 \mu\text{g Sn cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ (Directiva 89/677/CEE).

Esta medida legislativa foi transposta para o direito interno de cada um dos estados membros em diferentes datas. Em Portugal, por exemplo, foi transposta pelo D.L. 54/93 de 26 de Fevereiro de 1993. Após a implementação

destas medidas legislativas ocorreu um declínio da contaminação por TBT na água, sedimentos e tecidos de moluscos, acompanhado por uma diminuição da intensidade do impossexos e da deformação da concha nas ostras em locais anteriormente muito contaminados como a Baía de Arcachon ou o sudoeste de Inglaterra (Alzieu, 1996; Gibbs & Bryan, 1994). No entanto, esta diminuição não foi generalizada. Por exemplo, em Portugal verificou-se um aumento dos níveis de poluição 7 anos após a introdução da legislação (Barroso & Moreira, 2002; Santos *et al.*, 2002). Face a estes resultados, e sobretudo à descoberta de gastrópodes afectados por impossexos no mar aberto (ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 1994) e da detecção de TBT em mamíferos marinhos e em organismos e sedimentos de zonas abissais (Iwata *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1998), novas medidas legislativas foram propostas para fazer face à poluição global provocada pelo TBT.

Em 1992 na Conferência do Rio¹ foi adoptado o “Princípio da Precaução” (Secção 17.22 da agenda 21) relativamente ao uso deste biocida: ficou então acordado que se devia efectivar a implementação da proibição total de TBT a partir de 1 de Janeiro de 2003. Em 5 de Outubro de 2001, a IMO adoptou a “Convenção AFS²”, segundo a qual tintas com TBT não podem ser aplicadas ou reaplicadas em nenhum navio a partir de 1 de Janeiro de 2003 e os navios não podem conter estas tintas após 1 de Janeiro de 2008. A partir desta data os navios que ainda possuam tintas à base de TBT nos seus cascos terão que remover a pintura ou aplicar uma película que evite a libertação deste biocida para o ambiente. No entanto, esta convenção não foi ratificada por todos os países, o que implica, em termos práticos, uma transferência do problema, uma vez que os “lobbies” da indústria naval são muito poderosos e defendem a continuação da aplicação das tintas enquanto substitutos com igual eficácia não forem desenvolvidos. Prevê-se, então, uma transferência dos estaleiros para

¹ “UNCED: United Nations Conference on Environment and Development” no Rio de Janeiro, Brasil. O documento resultante da UNCED intitulado “Agenda 21” possui um capítulo dedicado aos compostos organoestânicos usados nas tintas antivegetativas (Capítulo 17: “States to take measures to reduce pollution caused by organotin compounds used in antifouling paints”)

² AFS Convention: “International Convention on the Control of Harmful Antifoulings on Ships” adoptada pela Organização Marítima Internacional (IMO)

países pouco desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, como alias já se registou na Tailândia (Chien *et al.*, 2002).

Esta possibilidade reforça a necessidade da ciência se aproximar cada vez mais dos decisores políticos, mantendo-se em permanente diálogo, de forma a garantir uma melhor protecção do ambiente marinho. Por outro lado torna-se imperiosa a necessidade de desenvolver novos sistemas antivegetativos não poluentes.

1.1.5. Efeitos do TBT nos gastrópodes: Imosexo

A presença de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de prosobrânquios foi pela primeira vez descrita por Blaber (1970) em *Nucella lapillus*; um ano mais tarde Smith (1971) observou o mesmo em fêmeas de *Ilyanassa obsoleta* e designou este fenómeno de “imosex”. Em 1981 a relação causa-efeito foi estabelecida e o TBT foi considerado como o indutor destas anomalias (Smith, 1981a, b). Ao longo das últimas décadas numerosos estudos revelaram a incidência de imosexo em mais de 150 espécies de gastrópodes e a sua relação com a contaminação por TBT. O imosexo é o mais evidente exemplo conhecido de disruptão endócrina em invertebrados (Matthiessen & Gibbs, 1998).

O nível de imosexo nas populações é determinado recorrendo a diferentes índices (%I: percentagem de fêmeas afectadas, VDSI: sequência do vaso deferente, RPSI: tamanho relativo do pénis das fêmeas, RPLI: comprimento relativo do pénis das fêmeas, FPL: comprimento do pénis das fêmeas, AOS: grau de convolução do oviducto) que permitem avaliar o nível de contaminação por TBT com elevada precisão e custos reduzidos. A biomonitorização é extremamente eficaz uma vez que, em alguns casos, os organismos reagem a concentrações abaixo dos limites químicos de detecção (Oelmann *et al.*, 1996). Esta previsão da poluição ambiental baseia-se nas elevadas correlações observadas entre os níveis de imosexo e as concentrações ambientais de TBT para várias espécies (Gibbs & Bryan, 1996; Stroben *et al.*, 1992a, b). O

desenvolvimento e evolução do imposexo em prosobrânquios encontra-se descrito na Fig. 1.8.

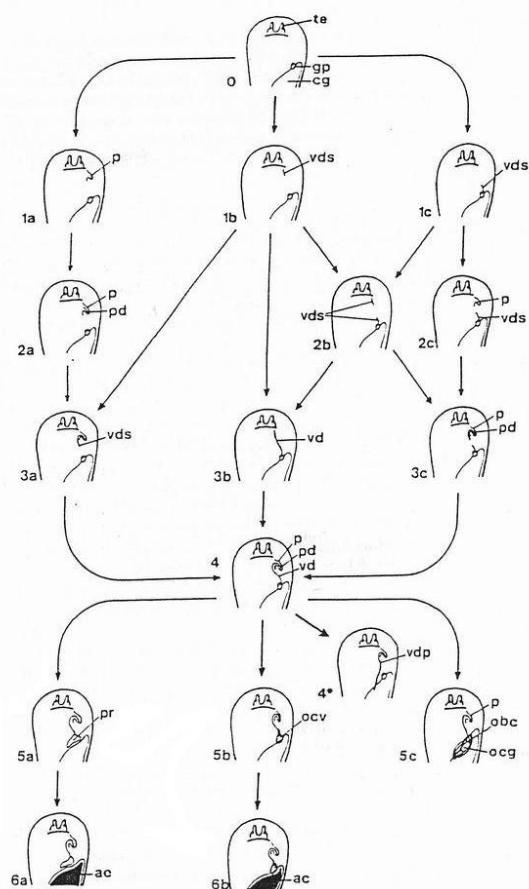


Figura 1.8. Esquema geral de desenvolvimento do imposexo em prosobrânquios, adaptado de Stroben *et al.* (1992). Ac: cápsulas abortadas, cg: glândula da cápsula, gp: papila genital, obc: bursa copulatrix aberta, ocg: glândula da cápsula aberta, ocv: oclusão da vulva, p: pénis, pd: ducto penial, pr: próstata, te: tentáculo, vd: vaso deferente, vpd: passagem do vaso deferente pela glândula da cápsula, vds: secção do vaso deferente.

O mecanismo de indução do imposexo não se encontra ainda totalmente esclarecido mas várias teorias tentam explicar o fenómeno, nomeadamente as teorias da inibição da aromatase, da inibição da excreção de testosterona e dos efeitos sobre o sistema neuroendócrino.

Teoria da inibição da aromatase

Segundo esta teoria a indução do imosexo não se deve à acção directa do TBT sobre os organismos mas é mediada por um aumento do nível dos androgénios. Este composto provoca distúrbios na síntese das hormonas esteróides inibindo a aromatização dos androgénios (androstenediona e testosterona) a estrogénios (estrana e 17β estradiol) através de uma inibição competitiva do citocromo P450 (Bettin *et al.*, 1996; Oehlmann *et al.*, 1996; Matthiessen *et al.*, 1998).

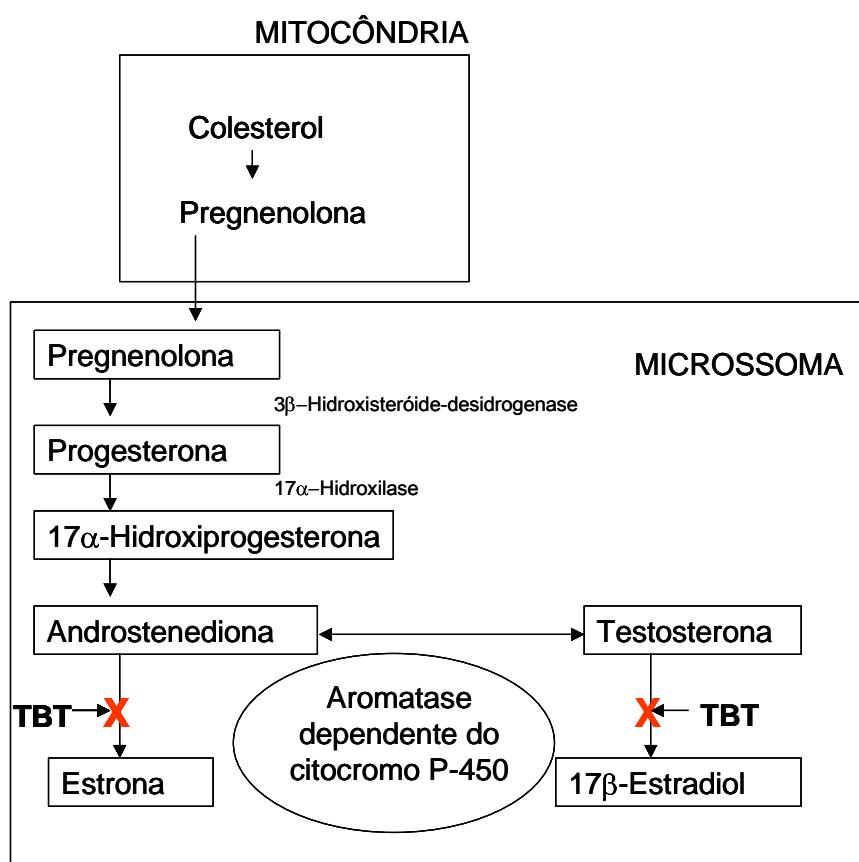


Figura 1.9. Esquema da biossíntese de hormonas esteróides com indicação do possível alvo do TBT, adaptado de Bettin *et al.* (1996).

Teoria da inibição da excreção de testosterona

O TBT promove o desenvolvimento de imosexo inibindo a excreção eficaz da testosterona. Este mecanismo foi proposto por Ronis & Mason (1996) para *Littorina littorea* e propõe a inibição de enzimas do grupo das transferases e reductases.

Teoria dos efeitos sobre o sistema neuroendócrino

Feral & Le Gall (1993) defendem que o TBT actua directamente nas neurohormonas que controlam o desenvolvimento sexual e a reprodução. Sabendo que o sistema endócrino dos moluscos é controlado em grande parte por neurohormonas e não por hormonas esteróides (Le Blanc *et al.*, 1999) parece razoável admitir que o TBT actua a um nível superior influenciando directamente os neuropeptidos que controlam a diferenciação sexual e as funções reprodutivas. Assim, Oberdörster & McClellan-Green (1998, 2000) propõem que o TBT actua como neurotoxina provocando a libertação anormal do neuropéptido PMF (factor morfogenético do pénis) que conduz ao desenvolvimento inicial dos ASO (órgãos sexuais acessórios: ducto espermático, vesícula seminal e pénis) que por sua vez libertam androgénios. Assim, o TBT actua a nível do sistema nervoso e os esteróides actuam no mecanismo de feedback positivo que mantém os ASO [Fig 1.10]. O neuropeptido APGMamida é proposto por estes autores como o potencial candidato a PMF (de salientar que este neuropeptido ainda não foi caracterizado). A APGMamida induz imosexo em grau superior ao induzido pelo TBT e pela testosterona e é biologicamente activo a concentrações de 10^{-16} M.

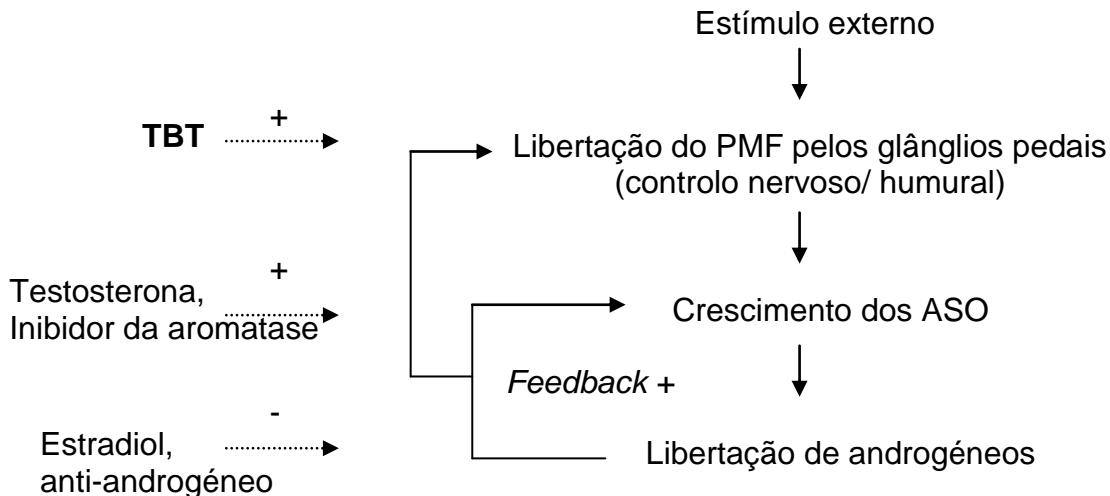


Figura 1.10. Mecanismo hipotético da indução de imposxo por TBT e esteróides, adaptado de Oberdörster & McClellan-Green (2000). O símbolo (+) indica indução do imposxo e o símbolo (-) representa inibição; ASO: orgāos sexuais acessórios; PMF: factor morfogenético do pénis.

1.1.6. *Nassarius reticulatus*: breve caracterização

Nassarius reticulatus (L.) é um gastrópode marinho do grupo dos prosobrânquios com uma ampla distribuição geográfica que se estende desde as Canárias e Açores até ao Norte da Noruega e em todo o mar Negro e Mediterrâneo (Fretter & Graham, 1984).

Tabela 1.3. Classificação taxonómica de *Nassarius reticulatus* (L.) (Graham, 1998).

Phylum	Mollusca
Classe	Gastropoda
Subclasse	Prosobranchia
Ordem	Caenogastropoda
Superfamília	Buccinaceae
Família	Nassariidae
Género	<i>Nassarius</i>
Espécie	<i>Nassarius reticulatus</i> (Linné, 1758)

Esta espécie é também conhecida por *Buccinum reticulatum* (Linné, 1758), *Nassa reticulata* (Linné, 1758), *Hinia reticulata* (Linné, 1758). Possui uma concha de alta espiral, com o vértice sempre ausente, apresenta uma ornamentação formada por numerosas costas e estrias espirais que se cruzam originando um padrão reticulado. A abertura é pequena, oval, com um canal sifonal pequeno e oblíquo. O labro possui externamente uma calosidade e internamente uma crista com 6 a 9 dentes. As dez voltas encontram-se em suturas que estão evidenciadas por uma pequena crista subsutural espiral (Graham, 1988).

Tem aproximadamente 30 mm de altura máxima, 14 de largura e a última volta ocupa 60 a 70% da concha e a abertura 40 a 50% [Fig 1.11]. A cabeça possui 2 tentáculos cada um dos quais com um olho. O sifão projecta-se muito para fora do canal sifonal. O pé é longo e estreito, a sua parte anterior possui pontos laterais recurvados, a parte posterior apresenta-se em forma de V, terminando cada lóbulo num tentáculo. Os animais são pretos e castanhos com pigmentação branca (Graham, 1988).

Habitam preferencialmente sedimentos vasosos mas podem ocorrer em substrato rochoso e arenoso; são necrófagos e a sua longevidade pode atingir os 15 anos (Barroso & Moreira, 1998; Fretter & Graham, 1994; Tallmark, 1980). Uma extensa revisão bibliográfica sobre aspectos da ecologia e biologia deste organismo pode ser encontrada em Fretter & Graham (1994).

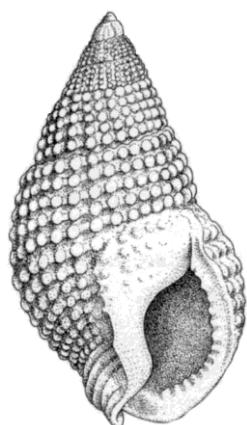


Figura 1.11. *Nassarius reticulatus* (L.) aspecto geral da concha, adaptado de Hayward & Ryland (1995).

N. reticulatus é uma espécie dióica com desenvolvimento indirecto; as suas larvas são planctónicas e nadam livremente durante aproximadamente um a dois meses até à ocorrência da metamorfose (Fretter & Graham, 1994).

O ciclo reprodutivo de *N. reticulatus* exibe um padrão sazonal bem definido com o início da gametogénesis em finais do Verão, a libertação dos gametas em Fevereiro, associada a um aumento da temperatura da água; a postura ocorre na Primavera e Verão (Tallmark, 1980; Barroso & Moreira, 1998).

A postura de *N. reticulatus* consiste na deposição de cápsulas ligeiramente côncavas com aproximadamente 5 mm de altura e 4 mm de largura com um disco basal de fixação a partir do qual aderem ao substrato. Cada cápsula contém aproximadamente 50 a 350 ovos que são libertados sob a forma de velígeras aproximadamente duas a quatro semanas após a postura. As larvas possuem um véu inicialmente bilobado que apresenta no seu bordo exterior pigmentação castanho avermelhada. A concha apresenta uma superfície lisa, sem ornamentações, transparente e possui uma única volta. No centro do labro externo localiza-se uma leve protuberância denominada bico. Em cada um dos lados do bico existe uma cavidade que aloja o véu. À medida que o bico cresce sofre uma evolução para o interior permitindo que as duas cavidades se tornem mais profundas à medida que o véu também aumenta de tamanho [Fig 1.12]. No final desta fase as larvas podem nadar e rastejar com o apoio do rudimento do pé, pouco depois ocorre a metamorfose a partir da qual o animal adquire as características do adulto (Fretter & Graham, 1994; Lebour, 1931).

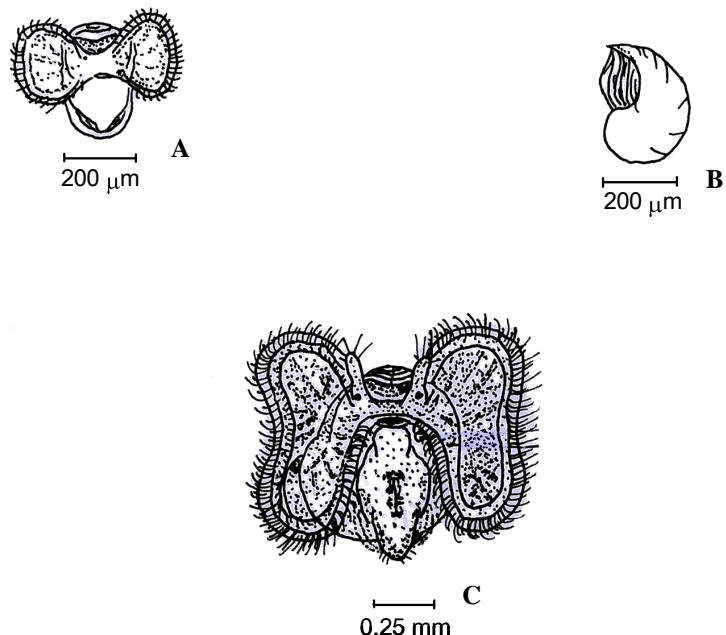


Figura 1.12. *Nassarius reticulatus*. (A) Larva acabada de eclodir; (B) Concha; (C) Larva com 40 dias, adaptado de Fretter & Graham (1994).

1.1.7 *Nassarius reticulatus*: Utilização do imosexo como biomarcador da poluição por TBT

A biomonitorização da poluição por TBT usando o gastrópode *Nassarius reticulatus* surgiu da necessidade de encontrar uma espécie com uma vasta distribuição geográfica, tolerante a baixas salinidades e menos sensível que a espécie tradicionalmente utilizada (*Nucella lapillus*), por forma a permitir a monitorização de zonas moderadamente a muito poluídas. Stroben *et al.* (1992a) foram os primeiros autores a propor esta espécie como biomarcadora da poluição por TBT. Ao longo das duas últimas décadas vários autores usaram esta espécie para a biomonitorização de sistemas estuarinos e costeiros (Bryan *et al.*, 1993; Stroben *et al.*, 1992a, 1992b; Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2002a, 2002b) e novos índices para a quantificação dos valores de imosexo foram propostos. O imosexo em *N. reticulatus* é quantificado utilizando os índices seguidamente descritos.

Percentagem de fêmeas afectadas por imosexo (%)

Esta medida é útil para locais pouco poluídos, uma vez que em locais com poluição moderada a elevada as fêmeas afectadas por imosexo atingem sempre 100%.

Comprimento relativo do pénis das fêmeas (RPLI)

O pénis de *N. reticulatus* é longo e estreito pelo que é calculado o comprimento relativo do pénis e não o volume (RPLI= comprimento pénis fêmeas*100/Comprimento pénis machos); este índice deve ser usado com alguma precaução uma vez que os machos exibem uma variação considerável no tamanho do pénis ao longo do ciclo reprodutor (Barroso & Moreira, 1998), por este motivo as campanhas de monitorização devem ser realizadas sempre na mesma altura do ano. É especialmente indicado para monitorizar áreas muito poluídas (Stroben *et al.*, 1992a).

Percentagem de fêmeas estéreis (% STER)

A esterilidade em *N. reticulatus* ocorre em populações severamente afectadas com imosexo. Nos primeiros trabalhos com esta espécie não foram encontradas evidências de esterilidade (Stroben *et al.*, 1992a, b; Gibbs & Bryan, 1996), no entanto, ao longo dos últimos anos foram encontradas fêmeas estéreis em locais altamente contaminados no Oeste de França (Huet *et al.*, 1995), nas rias do Noroeste de Espanha (Barreiro *et al.*, 2001) e alguns portos de Portugal, nomeadamente Viana do Castelo, Leixões, Figueira da Foz, Peniche e Lisboa; (Barroso *et al.*, 2002).

Grau de convolução do oviducto (AOS)

Este índice reflecte as alterações a nível do oviducto, nomeadamente, uma convolução que se assemelha à vesícula seminal masculina. Este

fenómeno foi descrito pela primeira vez por Stroben *et al.* (1992) em França mas afectava apenas 2% das fêmeas analisadas; foi posteriormente descrito por Barreiro *et al.* (2001) que sugeriram o seguinte esquema de classificação:

- AOS 0: Oviducto sem alterações;
- AOS 1: Oviducto com ligeira sinuosidade;
- AOS 2: Oviducto convolucionado.

Sequência do vaso deferente (VDSI)

Este índice foi desenvolvido por Stroben *et al.* (1992a) e considerado por estes autores como o mais adequado para a biomonitorização. Baseia-se no desenvolvimento e evolução do imosexo em *N. reticulatus* [Fig. 1.14].

Estádio 0: Fêmea normal ou não afectada;

Estádio 1: Pénis rudimentar sem ducto penial, localizado por detrás do tentáculo direito. Pode existir uma via b, caracterizada pela ausência de pénis mas presença de um pequeno segmento de vaso deferente localizado por detrás do tentáculo direito;

Estádio 2: Pénis com ducto penial;

Estádio 3: *Tipo a:* Pénis com ducto penial que continua num tracto distal do vaso deferente que cresce em direcção à vulva; *Tipo b:* Ausência de pénis, o vaso deferente encaminha-se para o interior do manto;

Estádio 4: Pénis com ducto penial e um vaso deferente contínuo que se estende desde a base do pénis até à vulva.

Estádio 4+: O vaso deferente passa a vulva e atinge a glândula da cápsula.

Face à existência de elevados níveis de imosexo na costa Portuguesa Barroso *et al.* (2002) consideram o estádio 4+ como 5, na medida em que muitas fêmeas de locais contaminados exibem vasos deferentes que ultrapassam a glândula da cápsula. No presente trabalho foi considerado este último sistema classificativo.

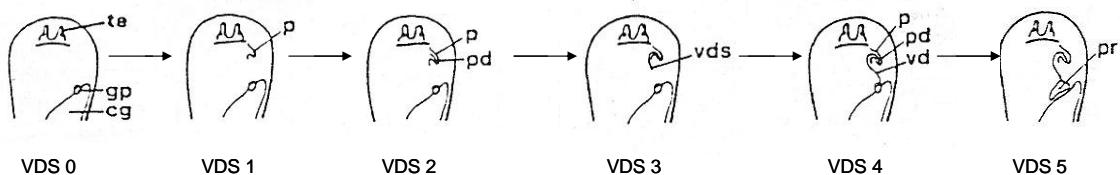


Figura 1.14. Esquema da evolução do imposexo (tipo a) adaptado de Stroben *et al.* (1992a) com os diferentes estádios representados. cg: glândula da cápsula, gp: papila genital, p: peno, pd: ducto peniano, vd: vaso deferente, vds: secção do vaso deferente, te: tentáculo.

Vários estudos evidenciam correlações significativas entre os vários índices de imposexo e a concentração de TBT nos tecidos das fêmeas pelo que esta espécie se encontra validada como espécie bioindicadora da poluição ambiental por tributilestanho (Stroben *et al.*, 1992a, b; Bryan *et al.*, 1993; Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2002).

1.1.8. Sistemas antivegetativos alternativos

Como consequência das medidas legislativas impostas nas duas últimas décadas vários produtos alternativos ao TBT foram surgindo. As tintas antivegetativas podem possuir vários tipos de biocidas que não o TBT, nomeadamente compostos de mercúrio, óxidos de cobre, compostos orgânicos de arsenatos, de chumbo, de halogenatos, de sulfatos ou compostos de zinco. Os compostos de chumbo e de mercúrio não são permitidos em muitos países, incluindo os países pertencentes à União Europeia, devido à sua toxicidade e elevada persistência no ambiente (Omae, 2003a).

O sistema antivegetativo actualmente mais utilizado consiste numa matriz solúvel em água que contém o biocida, normalmente um composto de cobre que por não ser efectivo contra algas tem que ser conjugado com biocidas secundários. Assim, estes biocidas são conhecidos como “Organic Booster Biocides” e são normalmente agroquímicos [Tabela 1.8]. Estes compostos têm sido utilizados ao longo dos últimos anos e concentrações elevadas foram

detectadas em várias regiões costeiras do mundo (para uma revisão consultar Omae, 2003b).

Tabela 1.8. Exemplos de “Organic Booster Biocides” e suas propriedades. A título comparativo o TBT e o Cobre são referidos no final da tabela, adaptado de Omae (2003b). $T_{1/2}$: tempo de meia vida.

Biocida	Solubilidade (mg/L)	Taxa libertação ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{dia}^{-1}$)	$T_{1/2}$ na água do mar	Outras aplicações
Irgarol 1051	7	5.0	100 dias	Herbicida
Diuron	35	3.3		Herbicida
Peritionato de zinco	8	3.3	< 24 h	Bactericida, fungicida
Sea-nine 211	14	2.9	< 24 h	Nenhuma
TCMTB	10.4		740 h	Fungicida
Cloroetanoilo	0.9		1.8 dias	Fungicida
Zined	0.07-10		96 h	Fungicida
Óxido de cobre		25-40		
TBT		1.5-4.0	Semanas a meses	

A maior parte dos biocidas alternativos actualmente comercializados devem ser encarados como uma solução provisória e não como uma solução definitiva contra o biofouling, devido aos efeitos tóxicos, elevado potencial de poluição ambiental e aos elevados custos. Por outro lado, segundo a directiva europeia sobre biocidas (98/8/EC) a biodegradabilidade é um dos critérios mais importantes para que uma dada substância seja autorizada. Como a maior parte dos biocidas alternativos não é facilmente biodegradável a sua utilização deverá ser restringida no futuro (Rasmussen *et al.*, 1999). Assim, novas alternativas não tóxicas têm sido investigadas e aplicadas aos cascos dos navios. Entre elas destacamos os produtos naturais, as “películas não adesivas”, as “películas espinhosas” e a electricidade.

Produtos naturais

Alguns organismos marinhos como os corais, as esponjas, macrófitas, golfinhos, etc., têm a capacidade de manter a sua superfície corporal livre de organismos incrustantes libertando substâncias antivegetativas. Estas substâncias estão a ser alvo de uma intensa investigação e alguns compostos foram já isolados e são actualmente utilizados na composição de tintas antivegetativas (Omae, 2003b).

“Películas não adesivas”

Consistem na aplicação de uma película, normalmente de silicone, que previne a fixação de organismos. Como não é tóxica a adesão de organismos pode ocorrer mas à medida que a velocidade da embarcação aumenta estes organismos vão sendo libertados. É recomendada para embarcações com velocidades superiores a 30 nós (IMO, 1999).

“Películas espinhosas”

São constituídas por microespículas que previnem a adesão de cracas e algas, no entanto aumentam significativamente o atrito pelo que são quase exclusivamente utilizadas em equipamento estático, como bóias, equipamento de aquacultura, etc. (IMO, 1999).

Electricidade

É criado um campo eléctrico entre o casco do navio e a água do mar que impede a fixação dos organismos, é muito efectivo contra o biofouling, no entanto, acarreta elevados custos económicos e potencia a corrosão do casco.

1.2. Objectivos gerais e descrição do trabalho

O presente estudo tem como objectivo geral avaliar a extensão e o nível da poluição por tributilestanho (TBT) na Costa Portuguesa utilizando como espécie indicadora o gastrópode *Nassarius reticulatus*. Pretende, também, avaliar os efeitos biológicos deste tipo de poluição nesta espécie e, por extração, noutras espécies que ocorrem na Costa Portuguesa. Em função destes objectivos fundamentais foram avaliados os gradientes espaciais e temporais da poluição por TBT na Costa Portuguesa e foram estudados os seus efeitos ao nível das populações em fases distintas do ciclo de vida do organismo: fase adulta e fase larvar.

A presente dissertação é apresentada sob a forma de três artigos científicos (Capítulos 2, 3 e 4), acompanhados por uma introdução geral (Capítulo 1) que pretende dar uma visão integrada sobre o debate em torno do TBT, e uma conclusão final (Capítulo 5) que resume e interpreta os principais resultados obtidos.

No capítulo 2 descrevem-se os actuais níveis de imosexo e de compostos organoestânicos nos tecidos das fêmeas de *N. reticulatus*. Descrevem-se os gradientes de poluição associados à proximidade dos portos e estuda-se a variação temporal da poluição comparando os resultados obtidos com os dados publicados para a Costa Portuguesa no ano 2000.

Dada a excelente correlação entre os níveis de imosexo e as concentrações de TBT descritas por diversos autores, e reforçadas no presente trabalho, a monitorização da poluição ao longo do gradiente costa-largo (descrita no capítulo 3) foi realizada utilizando os valores de imosexo observados nesta espécie.

Estudados os níveis de poluição na nossa costa e os efeitos da poluição por TBT nas populações de *N. reticulatus* é realizado no capítulo 4 o estudo dos efeitos deste composto na fase larvar desta espécie. Foram conduzidos testes de toxicidade aguda em velígeras recém eclodidas e foi estudado o possível impacto do composto na mortalidade larvar e, consequentemente, no recrutamento das populações.

Referências

- 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) Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. *Ecotoxicology* 9 (1-2): 71-76
- Alzieu C, Héral M, Thibaud Y, Dardignac MJ & Feuillet M (1981) Influence des peintures antiallisseurs à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Revue des Travaux des Pêches Maritimes* 45 : 101-116
- Alzieu C (1996) Biological effects of tributyltin on marine organisms. In de Mora SJ (Ed.) *Tributyltin: case study of an environmental contaminant*. Cambridge environmental chemistry series No. 8. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 167-205
- Aw TY, Nicotera P, Manzo L & Orrenius S (1990) Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Archives Biochemistry and Biophysics* 283: 46
- Barreiro R, González R, Quintela M & Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. *Marine Ecology Progress Series* 218: 203-212
- Barroso CM & Moreira MH (1998) Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* 78: 1233-1246
- Barroso CM & Moreira MH (2002) Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese Coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. *Marine Pollution Bulletin* 44: 480-48
- Barroso CM, Moreira MH & Gibbs PE (2000) Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a Southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Marine Ecology Progress Series* 201: 221-232
- Barroso CM, Moreira MH & Bebianno MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series* 230: 127-135

Batley GE, Mann KJ, Brockbank CI & Maltz A (1989) Tributyltin in Sydney Harbour and Georges River Waters. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 40: 39-48

Batley G (1996) The distribution and fate of Tributyltin in the marine environment. In de Mora SJ (Ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge environmental chemistry series No. 8. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 139-166

Bennett RF (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In de Mora SJ (Ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge environmental chemistry series No. 8. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 21-61

Bettin C, Oehlmann J & Stroben E (1996) TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgoländer Meeresunters 50: 299-317

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

le Blanc GA, Campbell PM, den Besten P, Brown RP, Chang ES, Coats JR, de Fur PL, Dhadialla T, Edwards J, Riddiford LM, Simpson MG, Snell TW, Thorndyke M & Matsumura F (1999) The endocrinology of vertebrates. In de Fur PL, Crane M, Ingersoll C & Tattersfield L (Ed) Endocrine disruption on invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. Pensacola, FL: SETAC Press, pp. 23-106

Bouchard N, Pelletier E & Fournier M (1999) Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. Environmental Toxicology and Chemistry 18: 519-522

Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE & Pascoe PL (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom 73: 913-929

Cameron JA, Kodavanti PRS, Pentyala SN & Desaiah D (1991) Triorganotin inhibition or rat cardiac adenosine triphosphatases and catecholamine binding. Journal of Applied Toxicology 11: 403

Champ MA & Seligman PF (1996) An introduction to organotin compounds and their use in antifouling coating. In Champ MA & Seligman PF (Eds) Organotin – Environmental Fate and Effects. Chapman & Hall, London, pp. 1-25

Chien L-C, Hung T-C, Choang K-Y, Yeh C-Y, Meug P-J, Shieh M-J & Han B-C (2002) Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *The Science of the Total Environment* 285: 177-185

Chow SC, Kass GNE, McBale MJ & Orrenius S (1992) Tributyltin increases cytosolic free Ca^{+2} concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca^{+2} , activating a Ca^{+2} entry pathway, and inhibiting Ca^{+2} efflux. *Archives Biochemistry Biophysics* 298: 143

Cima F & Ballarin L (*In press*) Tributyltin–sulfhydryl interaction as a cause of immunotoxicity in phagocytes of tunicates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Clayton ME, Steinnann R & Fent K (2000) Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquatic Toxicology* 47: 213-226

Fent K (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 26: 1-117

Fent K & Stegeman JJ (1991) Effects of tributyltin chloride on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquatic Toxicology* 20: 159

Féral C & LeGall S (1983) The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. In Oberdörster E & McClellan-Green (2000) The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21: 1323-1330

Fretter V & Graham A (1984) The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8 – Neogastropoda. *Journal of Molluscan Studies* (supp. 15)

Fretter V & Graham A (1994) British prosobranch molluscs, their functional anatomy and ecology. The Ray Society, Dorset Press, Dorset

Gadd GM (2000) Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *The Science of the Total Environment* 258: 119-127

Gibbs PE & Bryan GW (1986) Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* 66: 767-777

Gibbs PE & Bryan GW (1994) Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropods molluscs. In Kramer KJM (Ed) *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 205-226

Gibbs PE & Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In Mora SJ (Ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge environmental chemistry series 8, pp. 212-236

Gibbs PE, Pascoe PL & Burt GR (1988) Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom 68: 715-731

Godoi AFL, Favoreto R & Santiago-Silva M (2004) Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. Química Nova 26 (5): 708-716

Golderg ED (1986) TBT: An environmental dilemma. Environment 28: 17-44

Gomes-Ariza JL, Giraldez I & Morales E (2001) Occurrence of organotin compounds in water, sediments and mollusca in estuarine systems in the Southwest of Spain. Water, Air, and Soil Pollution 126: 253-270

Graham AFRS (1988) Molluscs: prosobranch and pyramidellid gastropods. In Kermack DM, Barnes SK (Ed) *Synopses of the British Fauna*, 2nd ed. New Series Nº 2. London: The Linnean Society of London and the Brackish-Water Science Association, pp. 186-189

Hagger JA, Fisher AS, Hill SJ, Depledge MH & Jha AN (2002) Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-n-butyltin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). Aquatic Toxicology 57: 243-255

ten Hallers-Tjabbes CC, Kemp JF & Boon FP (1994) Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. Marine Pollution Bulletin 28 : 311-313

Hartl MGJ, Hutchinson S & Hawkins LE (2001) Organotin and osmoregulation: quantifying the effects of sediment-associated TBT and TPhT on the freshwater- adapted European flounder, *Platichthys flesus* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 256: 267-278

Hayward PJ & Ryland JS (1995) Handbook of the marine fauna of North-West Europe. Oxford University Press, Oxford, 800 pp

Hoch M (2001) Organotin compounds in the environment - an overview. Applied Geochemistry 16: 719-743

Huet M, Fioroni P, Oehlmann J & Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. Hydrobiologia 309: 29-35

IMO 1999. Sistemas anti-incrustantes: hacia una solucion no tóxica [on line]. London: International Maritime Organization. [cited 30/09/2003]. Available from: http://www.imo.org/includes/blastDataOnly.asp?data_id%3D2319/Antifoulingspanish.pdf.

Iwata H, Tanabe S, Mizuno T & Tatsukawa R (1995) High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japonese coastal waters. Environmental Science and Technology 29: 2959-2962

IPCS (1990) Environmental Health Criteria 116 – Tributyltin Compounds. Who, Geneva, 273 pp

Jha AN, Hagger JA, Hill SJ & Depledge MH (2000) Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO): an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species. Marine Environmental Research 50: 565-573

Kannan K & Falandysz J (1997) Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour popoise and human tissues from Polish Coast of the Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin 34: 203-207

Kannan K, Senthilkumar K & Giesy JP (1999) Occurrence of butyltin compounds in human blood. Environmental Science and Technology 33: 1776-1779

van der Kerk GJM & Luitjen JGA (1954) The biocidal properties of organotin compounds. Journal of Applied Chemistry 4: 314-319 in Hoch M (2001) Organotin compounds in the environment - an overview. Applied Geochemistry 16: 719-743

Laughlin RB (1996) Bioaccumulation of TBT by aquatic organisms. In Champ MA & Seligman PF (Eds) Organotin – Environmental Fate and Effects. Chapman & Hall, London, pp. 331-319

Lebour MV (1931) The larval stages of *Nassarius reticulatus* and *Nassarius incrassatus*. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom 17: 797-818

Mamelona J & Pelletier E (2003) Butyltins biomagnification from macroalgae to green sea urchin: a field assessment. Applied Organometallic Chemistry 17: 759–766

Marin MG, Moschino V, Cima F & Celli C (2000) Embryotoxicity of butyltin compounds to the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Marine Environmental Research 50: 231-235

Matthiessen P & Gibbs PE (1998) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Environmental Toxicology Chemistry 17(1): 37-43

de Mora SJ (1996) The tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. In de Mora SJ (Ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge

Environmental Chemistry Series N° 8. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1-13

Oberdörster E & McClellan-Green P (2000) The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail *Ilyanassa obsoleta*. Peptides 21: 1323-1330

Oberdörster E, Rittschof D & McClellan-Green P (1998) Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: a compararion of field and TBTCI-induced imposex. Marine Pollution Bulletin 36: 144-151

Oehlmann J, Stroben E, Schulte-Oehlmann U & Bauer B (1996) Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassatta* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). Aquatic Toxicology 43: 239-260

Okoshi K, Mori K & Nonura T (1987) Characteristics of shell chamber formation between two races in Japonese oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture 67: 313-320

Omae I (2003a) Organotin antifouling paints and their alternatives. Applied Organometallic Chemistry 17: 81-105

Omae I (2003b) General Aspects of tin-free antifouling paints. Chemical Reviews 103: 3431-3448

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G & Nicotera P (1989) Role of Ca^{+2} in toxic cell killing. Trends Pharmacological Science 10: 281

Orrenius S, McCable MJJ & Nicotera P (1992) Ca^{+2} dependent mechanisms of cytotoxicology and programmed cell dead. Toxicological Letters 64/65: 357

OSPAR Commission (2000) Quality Status Report 2000: Region IV – Bay of Biscay and Iberian Coast (2000). London, OSPAR Commission, pp. 1-134

Pinkney AE, Wright DA, Jepson MA & Towle DW (1989) Effects of tributyltin compounds on ionic regulation and gill ATPase activity in estuarine fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology: 92-125

Raffray M & Cohen GM (1991) Bis(tri-n-butyltin) oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes. Archives Toxicology 65: 135

Rasmussen K, Chemin P & Haastrup P (1999) Regulatory requirements for biocides on the market in the European Union according to Directive 98/8/EC. Journal of Hazardous Materials 67: 237-251

Ronis MJJ & Masson AZ (1996) The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: effects of tributyltin. Marine Environmental Research 42: 161-166

Rurangwa E, Biegiewska A, Slominska E, Skorkowski EF & Ollevier F (2002) Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 3: 335-344

Saint-Louis R & Pelletier E (2004) Sea-to-air flux of contaminants via bubbles bursting: An experimental approach for tributyltin. Marine Chemistry 84 (3-4): 211-224

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

Sarapuk J, Kleszczynska H & Stanislaw P (2000) Stability of model membranes in the presence or organotin compounds. Applied Organometallic Chemistry 14: 40-47

Sarradin P-M, Lapaquellerie Y, Astruc M, Latouche C & Astruc M (1995) Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. Science of the Total Environment 170: 59-70

Selwyn MJ (1978) Triorganotin compounds as ionophores and inhibitors of ion translocating ATPases. In Zuckerman JJ (ed) Organotin Compounds: New Chemistry and Applications, American Chemical Society, Washington, DC

Smith BS (1971) Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. Proceedings of the Malacological Society of London 39: 377-378

Smith BS (1980) The estuarine snail, *Nassarius obsoletus*: abnormalities in the reproductive system. Journal of Molluscan Studies 46: 247- 256

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

Stephenson MD, Smith D, Goetzl J, Ichikawa G & Martin M (1996) Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay. In Proceedings of the organotin Symposium, Oceans '86 Conference, Washington DC, 23-25

September, New York, The Institute of Electrical and Electronical Engineers Inc, Vol 4, p 1246-1251

Stroben E, Oehlmann J & Fioroni P (1992a) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology* 113: 625-636

Stroben E, Oehlmann J & Fioroni P (1992b). *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Marine Biology* 114: 289-296

Takahashi S, Lee JS, Tanabe S & Kubodera T (1998) Contamination and specific accumulation of organochlorine and butyltin compounds in deep-sea organisms collected from Suruga Bay, Japan. *The Science of the Total Environment* 214: 49-64

Takahashi S, Tanabe S, Takeuchi I & Miyazaki N (1999) Distribution and Specific bioaccumulation of butyltin compounds in a Marine Ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37: 50–61

Tallmark B (1980) Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Marine Ecology Progress Series* 3: 51-62

Tanabe S, Prudente M, Mizuno T, Hasegawa J, Iwata H & Miyazaki N (1998) Butyltin contamination in marine mammals from North Pacific and Asian coastal waters. *Environmental Science and Technology* 32: 193-198

Tessier E, Amouroux D & Donard OFX (2002) Volatile organotin compounds (butylmethyltin) in three European estuaries (Gironde, Rhine, Scheldt). *Biogeochemistry* 59: 161–181

Thain JE & Waldock MJ (1986) The impact of tributyltin (TBT) antifouling paints on molluscan fisheries. *Water Science Technology* 18: 193-202

Zucker RM, Elstein KH, Easterling RE, Ting-Beall HP, Allis JW & Massaro EJ (1988) Effects of tributyltin on biomembranes: alteration of flow cytometric parameters in inhibition of Na^+/K^+ - ATPase two-dimensional crystallization. *Toxicology and Applied Pharmacology* 96: 393

CAPÍTULO 2

**Imposex and organotin contamination in
Nassarius reticulatus (L.) along the Portuguese Coast**

Abstract

Nassarius reticulatus imposex levels and organotin body burden (b.b.) were surveyed along the Portuguese Coast, from Vila Praia de Âncora (north limit) to Lagos (south limit), between May and August 2003. The percentage of females affected with imposex (%I), the relative penis length index (RPLI), the vas deferens sequence index (VDSI) and the degree of female oviduct convolution index (AOS) were used to assess the level of imposex at each site. These imposex indices were determined for 23 sampling stations throughout the coast and ranged between 0.0-100%, 0.0-90%, 0.0-5.0 and 0.0-1.3, respectively. Sterile females (ie, females carrying aborted egg capsules inside the capsule gland) were found inside the harbours of Viana do Castelo (8.5%) and Aveiro (3.7%). Organotins were assessed in 10 sampling sites spread along the coast. Tributyltin (TBT) b.b. in females varied between 39-1679 ng Sn g⁻¹ dry weight (dry wt) whilst dibutyltin (DBT) and monobutyltin (MBT) varied between 23-1084 and 18-939 ng Sn g⁻¹ dry wt, respectively. Among the butyltins, the major fraction corresponded to TBT (50%) followed by DBT (25%) and MBT (23%), which indicate recent contamination. TPT levels ranged between <5 to 21 ng Sn g⁻¹ and TPT residue was on average 10% of the TBT residue. TPT was the dominant phenyltin and was quantifiable in 60% of the sampling stations. The imposex was significantly correlated to lnTBT (Spearman $r= 0.918$, $p< 0.001$ for RPLI; $r= 0.864$, $p< 0.001$ for VDSI; $r= 0.828$, $p< 0.01$ for AOS). The higher levels of imposex and TBT contamination occurred inside or close to harbours, which are diagnosed as the hotspots of pollution in the coast. Comparing the results obtained in the current work with those reported in a similar survey in 2000 we conclude that both indices

presented some rises or reductions at a local scale but they did not reveal any global trend in the variation of TBT pollution in the Portuguese coast over the 3-year period.

2.1. Introduction

Organotin compounds, tributyltin (TBT) and to a lesser extent triphenyltin (TPT), have been used as biocides in antifouling paints since 1960's (de Mora, 1996). Its deleterious effects on non-target organisms was recognised in the early 1980s mainly as the cause for the decline in oyster production (Alzieu *et al.*, 1981) and for imposex (Smith, 1981) - superimposition of male characters onto prosobranch females (Smith, 1971). Legislation to ban the use of organotin antifouling paints on boats smaller than 25m in length was introduced for the first time in France in 1982, mainly motivated by the negative impact of TBT pollution on oyster farming. Latterly, similar legislation was applied throughout Europe; in Portugal the use of TBT on small boats (<25m) was banned in 1993 and one year before the Portuguese Navy imposed a total ban on their ships. Nevertheless, pollution was still high at many sites of coastal and deep-sea waters of countries that adopted this regulation (Barroso & Moreira, 2002; Santos *et al.*, 2002; ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 2001; Minchin *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1998). As a consequence, in 2001 the International Maritime Organization (IMO) gave forth to the "International Convention on the Control of Harmful Systems on Ships" that bans the application of organotin antifouling paints on any boat after 1 January 2003 and forbids its usage after 2008.

The netted whelk *Nassarius* (=*Hinia*) *reticulatus* (L.) is a common European prosobranch gastropod that is distributed from the Black Sea and the Mediterranean, north to Norway and into the western Baltic (Graham, 1988). Recently this whelk has been successfully used as a bioindicator of tributyltin (TBT) pollution in European coastal waters (Stroben *et al.*, 1992; Bryan *et al.*, 1993; Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2002) through the assessment of the imposex levels and organotin body burdens in the populations. A survey of this type was conducted in 2000 along the Portuguese coast by Barroso *et al.* (2002).

The present work regards a re-survey conducted in 2003 that aims to assess the status of TBT pollution in the Portuguese coast in the year that the IMO ban took place; this will provide a baseline to track the future evolution of the TBT pollution in Portuguese waters and to evaluate the effectiveness of this ban in reducing the pollution levels. Furthermore, it aims to evaluate the temporal trend of organotin pollution over the last 3 years.

2.2. Methods

2.2.1. Sampling

Nassarius reticulatus was collected between May and August 2003 from 23 sampling stations (Stns) along the Portuguese Coast, between Vila Praia de Âncora (north limit) and Lagos (south limit) [Fig 2.1; Table 2.1]. Specimens were collected by hand at the intertidal shore and with baited hoop nets at sub-littoral sites. The animals were brought to the laboratory and maintained in aquaria with permanent aeration at constant temperature ($17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) for a period of about 3 days prior to analysis.

2.2.2. Biological examinations

About 60 adult specimens were analysed per station (i.e. those presenting white columellar callus and teeth on the outer lip). They were narcotised using 7% MgCl_2 in distilled water for 40 minutes and the shell heights (distance from shell apex to lip of siphonal canal) were measured with vernier callipers to the nearest 0.1 mm. The shells were then cracked open with a bench vice, and individuals were sexed and dissected under a stereo microscope. Parasitised specimens were discarded from the analysis. The percentage of females affected by imposex (% I), the relative penis length index (RPLI= mean female penis length x 100/mean male penis length), the vas deferens sequence index (VDSI) and the oviduct stage index (AOS) were determined for each station. The percentage of sterile females (%STER), i.e., females carrying aborted egg capsules inside the capsule gland,

was also determined. The penis length was measured using 1 mm graduated graph paper under a stereo microscope. The VDSI was classified according to the scoring system developed by Stroben *et al.* (1992a), with minor alterations proposed by Barroso *et al.* (2002). The degree of oviduct convolution (AOS) was ranked according to the 3-stage scale of Barreiro *et al.* (2001).

2.2.3. Organotin Analysis

For 10 selected stations TBT, dibutyltin (DBT), monobutyltin (MBT), triphenyltin (TPT) and diphenyltin (DPT) were measured in the whole tissues of 10-15 pooled females [Table 2.1]. The analyses were performed by the Servicios Xerais de Apoio á Investigación (Universidade da Coruña). The procedures used are described by Quintela *et al.* (2000) and are largely based on the methods of Szpunar *et al.* (1996). The analysis was performed for 2 separate replicates of each sample, and the results are given as mean values with the respective standard deviation. The detection limit of the method was 20 ng Sn g⁻¹ dry weight (dry wt) for butyltins (BTs) and 5 ng Sn g⁻¹ dry wt for TPT.

The extraction efficiency for TBT, DBT and MBT varied between 68-72%, 97-123%, 37-118%, whilst for TPT and DPT varied between 97-118% and 28-57%, respectively.

2.2.4. Statistical analysis

All statistical analysis was performed using the software Statistica 6.0. The correlation analysis refers to the non-parametric Spearman Rank Order Correlation. Comparison between VDSI values was made through the non-parametric Mann-Whitney U Test.

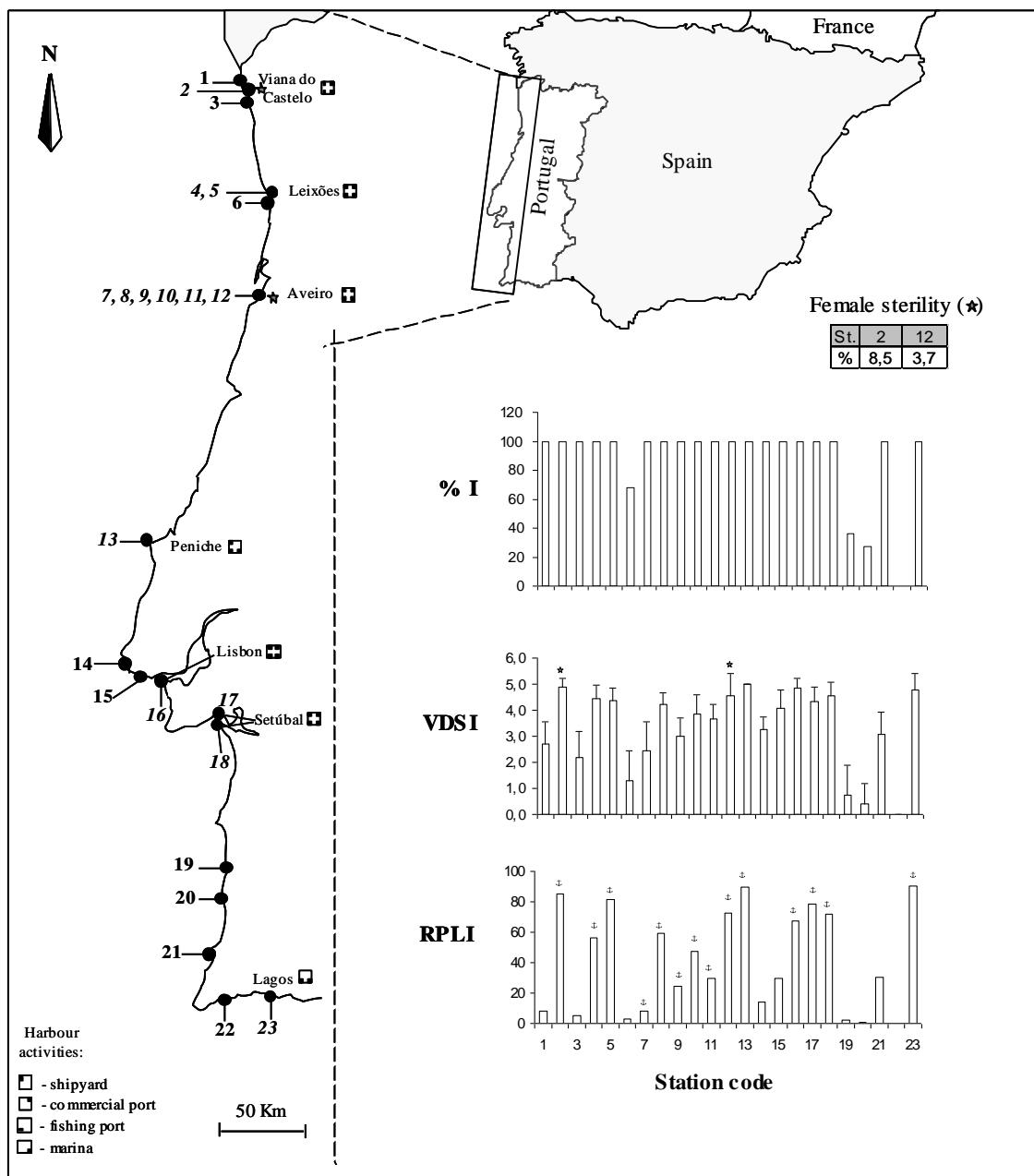


Figure 2.1. *Nassarius reticulatus*. Map of the Portuguese coast indicating the sites (1 to 23) where specimens were collected and the location of the main harbours. Italic code numbers represent sampling stations located inside harbours. The graphic bars represent values of relative penis length index (RPLI), vas deferens sequence index (VDSI) and imposex incidence (%I).

* Occurrence of female sterility. † Stations located inside ports.

Table 2.1. *Nassarius reticulatus*. Data relative to each sampling site with the indication of numbers of males (δ N) and females (φ N) with respective mean shell heights; percentage of affected females (%I), relative penis length index (RPLI); female oviduct convolution (AOS) and vas deferens sequence index (VDSI); mean tributyltin (TBT), dibutyltin (DBT), monobutyltin (MBT), triphenyltin (TPT) and diphenyltin (DPT) whole female body burden (b.b.). Standard deviations are given as a percentage of the mean. (a) 0 to 5%; (b) 5 to 10%; (c) 10 to 15%; (d) 15 to 20%; (e) 20 to 25%; (f) 25 to 30% (g) 30 to 40% (h) 40 to 50%; dry wt: dry weight; na: not analysed; nq: not quantifiable. For additional data compare Figure 2.1.

Station code and name	Coordinates (EUR 50)	δ (N)	δ shell height	φ (N)	φ shell height	% I	RPLI	AOS	VDSI	Tissue b.b.		ng Sn g ⁻¹ dry wt		
										TBT	DBT	MBT	TPT	DPT
1. Praia Norte	41°41.85N-8°51.13W	23	21.6 ^b	36	23.9 ^b	100	8.0	0.0	2.7	na	na	na	na	na
2. V. Castelo - Estaleiro	41°41.34N-8°50.26W	20	23.9 ^b	32	23.9 ^b	100	85.1	1.1	4.9	832 ^b	584 ^a	939 ^b	19 ^d	nq
3. Praia da Amorosa	41°38.72N-8°49.31W	20	23.1 ^b	41	21.1 ^b	100	5.1	0.0	2.2	na	na	na	na	na
4. Porto Leixões - Plat. 2	41°11.42N-8°41.43W	20	25.9 ^a	40	26.8 ^a	100	56.0	0.9	4.5	330 ^a	169 ^c	115 ^e	nq	nq
5. Porto Leixões – Marina	41°11.30N-8°42.24W	20	24.2 ^b	36	25.9 ^b	100	81.5	1.2	4.4	na	na	na	na	na
6. Praia da Foz	41°09.78N-8°41.10W	15	22.6 ^b	44	23.2 ^b	68.2	3.0	0.0	1.3	na	na	na	na	na
7. Aveiro – S. Jacinto	41°39.84N-8°43.56W	20	24.3 ^b	31	25.0 ^b	100	8.3	0.1	2.5	63 ^a	32 ^b	45 ^f	nq	nq
8. Aveiro – PCN	41°39.06N-8°43.76W	20	22.4 ^b	34	24.0 ^b	100	59.4	0.7	4.2	na	na	na	na	na
9. Aveiro – Barra	41°38.71N-8°44.82W	30	23.4 ^c	25	25.1 ^b	100	24.5	0.2	3.0	na	na	na	na	na
10. Aveiro – MM	41°38.65N-8°44.06W	25	24.9 ^b	30	25.6 ^b	100	47.1	0.5	3.9	218 ^a	61 ^a	69 ^c	nq	nq
11. Aveiro – FB	40°38.56N-8°43'59W	20	23.2 ^b	34	24.8	100	29.7	0.2	3.7	na	na	na	na	na
12. Aveiro – PPL	40°38.24N-8°43'59W	28	25.8 ^b	27	26.3 ^c	100	72.3	1.3	4.6	na	na	na	na	na
13. Peniche – Porto Pesca	39°21.15N-9°22.52W	24	21.8 ^b	26	21.1 ^b	100	90.0	1.1	5.0	1679 ^a	1084 ^a	637 ^a	21 ^b	21 ^a
14. Praia do Guincho	38°43.74N-9°28.46W	27	20.7 ^c	15	22.5 ^e	100	13.7	0.0	3.3	39 ^b	23 ^d	24 ^a	8 ^h	nq
15. Praia das Avencas	38°41.21N-9°21.27W	15	20.8 ^b	25	21.8 ^b	100	29.9	0.2	4.1	48 ^b	35 ^b	29 ^t	12 ^b	nq
16. Lisboa – Trafaria	38°40.55N-9°14.09W	15	19.7 ^c	34	20.5 ^c	100	67.4	0.9	4.9	400 ^a	103 ^a	69 ^b	8 ^c	nq
17. Setúbal – Porto Pesca	38°31.17N-8°52.58W	34	21.2 ^b	25	21.0 ^b	100	78.7	0.7	4.3	na	na	na	na	na
18. Setúbal - Tróia	38°26.25N-9°06.76W	26	20.7 ^b	25	20.9 ^b	100	72.0	1.3	4.6	185 ^a	143 ^c	103 ^b	16 ^g	nq
19. Vila Nova Mil Fontes	37°43.30N-8°47.25W	16	21.7 ^c	44	22.0 ^b	36.4	2.2	0.0	0.7	na	na	na	na	na
20. Zambujeira do Mar	37°33.20N-8°47.44W	20	21.5 ^b	33	23.4 ^b	27.3	0.6	0.0	0.4	na	na	na	na	na
21. Praia da Arrifana	37°18.82N-8°52.11W	22	22.0 ^b	11	22.9 ^c	100	30.7	0.1	3.1	86 ^a	30 ^b	18 ^b	nq	nq
22. Praia da Luz	37°05.21N-8°43.64W	23	17.7 ^c	36	19.3 ^b	0.0	0.0	0.0	0.0	na	na	na	na	na
23. Lagos - Marina	37°06.27N-8°40.52W	34	18 ^b	18	20.8 ^c	100	90.1	0.9	4.8	na	na	na	na	na

2.3. Results

2.3.1. Imposex and organotin body burden in *N. reticulatus*

Levels of *Nassarius reticulatus* imposex and female organotin b.b. obtained in the current survey are shown in Table 2.1. The %I varied from 0.0 to 100%, the RPLI varied between 0.0 and 90% and the VDSI ranged from 0.0 to 5.0. The degree of female oviduct convolution (AOS) varied from 0.0 to 1.3 and was significantly correlated with VDSI ($r=0.914$, $p<0.001$). The oviduct convolution occurred mostly on females with advanced stages of imposex (VDSI>2) [Fig. 2.2]. Sterile females were found inside the harbours of Viana do Castelo (Stn 2) and Aveiro (Stn 12), with an incidence of, respectively, 8.5% and 3.7% in the population. These sterile females presented advanced imposex stages (VDSI=5 and AOS>1) and did not exhibit any vulva occlusion or capsule gland deformation. The TBT female b.b. ranged from 39 to 1679 ng Sn g⁻¹ dry weight (dry wt) whilst DBT and MBT varied between 23-1084 and 18-939 ng Sn g⁻¹ dry wt. Among the butyltins, the major fraction corresponded to TBT (50%), followed by DBT (25%) and MBT (23%) [Table 2.2]. TPT was the dominant phenyltin and was quantifiable in 60% of the stations whereas DPT was only detected at one sampling station (Stn 13= 21 ng Sn g⁻¹). TPT levels ranged between <5 to 21 ng Sn g⁻¹ and, when quantified, represented on average 10% of the TBT residue. No significant correlation ($r= 0.75$, $p= 0.08$) was found between TBT and TPT, although the observed significance was close to 0.05.

All imposex indices were significantly correlated to lnTBT ($r= 0.918$, $p< 0.001$ for RPLI; $r= 0.864$, $p< 0.001$ for VDSI; $r= 0.845$, $p< 0.001$ for FPLI and $r= 0.828$, $p< 0.01$ for AOS). Figure 2.3 illustrates the relationships between the TBT tissue concentration and the different imposex indices obtained in the current survey (white circles). The same figure also shows that these relationships are similar to that obtained by Barroso *et al.* (2002) in 2000 (dark points). For VDSI and RPLI there was a rapid increase and then both indices tended to a plateau of VDSI=4.6 and RPLI=87% at tissue concentrations of about 400 and 700 ng Sn g⁻¹ dry wt, respectively. For the range of values below the plateau significant

regressions were established between lnTBT and VDSI ($VDSI = 1.3 \cdot \ln TBT - 2.9$; $F=50.7$, $p<0.001$; $R^2=0.60$) and between lnTBT and RPLI ($RPLI = 27.7 \cdot \ln TBT - 90.8$; $F=141.8$, $p<0.001$; $R^2=0.78$).

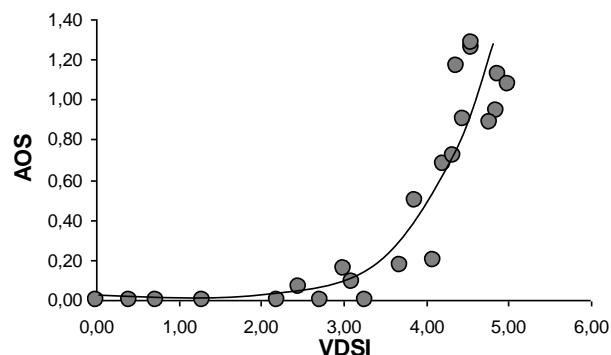


Figure 2.2. Relationship between VDSI and AOS. Line fitted by eye.

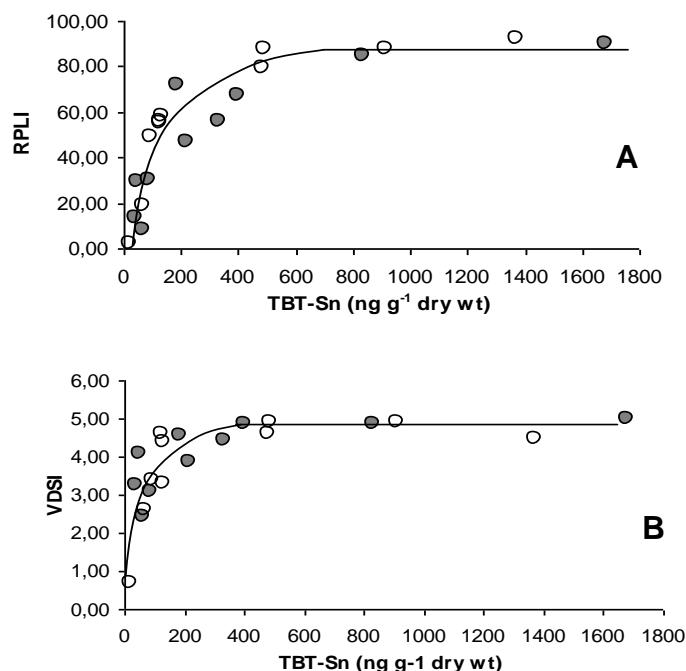


Figure 2.3. Relationship between the TBT body burden and the RPL and VDS imposex indices obtained in the current survey (white circles) and in 2000 survey (black circles). (A) RPLI vs TBT-Sn tissue concentration, (B) VDSI vs TBT-Sn tissue concentration. Lines fitted by eye.

2.3.2. Spatial variation of imposex and organotin body burden

An evident relationship was found between the organotin body burden or imposex levels in *N. reticulatus* and the proximity of harbours. The highest TBT values (from 185 up to 1679 ng Sn g⁻¹ dry wt and with an average ± standard-deviation of 607±574 ng Sn g⁻¹ dry wt) were found at stations located inside estuarine systems or embayments enclosing harbours (Stns 2, 4, 10, 13, 16 and 18) (see Fig. 2.1). The lowest values (from 39 to 86 ng Sn g⁻¹ dry wt and with an average ± standard-deviation of 58±25 ng Sn g⁻¹ dry wt) were found at sites on the open shore distant from harbours (Stns 14, 15, 21), although TBT pollution still occurs due to the presence of a considerable number of small fishing and leisure boats (see Fig. 2.1). Stn 7 is located at Ria de Aveiro, but nevertheless presents low contamination (63 ng Sn g⁻¹ dry wt) for being distant from the harbours and for having an intense water renovation from the sea.

Regarding imposex, sites located inside or close to the harbours of Viana do Castelo (Stn 2), Leixões (Stns 4, 5), Aveiro (Stns 8, 10-12), Peniche (Stn 13), Lisboa (Stn 16), Setúbal (Stns 17, 18) and Lagos (Stn 23) presented I%=100%, RPLI=30-90% (average ± standard-deviation of 69% ± 18%), VDSI=3.7-5.0 (4.5 ± 0.4) and AOS=0.2-1.3 (0.9 ± 0.3) [Fig. 2.1; Table 2.1]. The remainder stations, distant from harbours but nevertheless subjected to small boat traffic, presented I%=0-100% (76% ± 37%), RPLI=0-31% (12% ± 12%), VDSI=0.0-4.1 (2.1 ± 1.3) and AOS=0-0.2 (0.1 ± 0.1) [Fig. 2.1; Table 2.1]. On the other hand, increasing gradients of TBT pollution and imposex were observed approaching the hotspots [Fig. 2.1]. For instance, at Ria de Aveiro, the lowest imposex levels were found in stations near the mouth of the estuary (Stns 7, 9) while the highest levels were registered inside or close to harbours (Stns 8, 11, 12). Similar trends were also observed around the harbours of Viana do Castelo, Leixões and Lisbon. In the latter case, for example, as we approached the harbour there was an increase of TBT b.b. and imposex: Stn 14 (RPLI ≈ 14%, VDSI ≈ 3, TBT bb 39 ng Sn g⁻¹), Stn 15 (RPLI ≈ 30%, VDSI ≈ 4, TBT bb 48 ng Sn g⁻¹) and Stn 16 (RPLI ≈ 67%, VDSI ≈ 5, TBT bb 400 ng Sn g⁻¹).

2.3.3. Temporal variation of imposex and organotin body burden

Temporal comparisons of imposex levels and organotin b.b. in *N. reticulatus* for common sites sampled in 2000 (Barroso *et al.*, 2002) and in 2003 are shown in Table 2.2. The imposex and organotin analysis was performed in both occasions by the same laboratory and using identical methods. TPT female b.b. decreased in all but one station analysed but the TBT levels showed a distinct tendency: they decreased at Stns 2, 4, 7, 14, 15, 16 and increased at Stns 10, 13, 18 and 21 [Table 2.2]. Many factors such as temporal variations of naval traffic and of shipyard activity may cause different inputs of TBT to the environment, which will ultimately cause variant TBT tissue contamination. The same is true for TPT although inputs from agriculture pesticides must also be considered (Fent, 1996). Table 2.3 shows the variation of the commercial ship traffic, expressed in terms Tonnage, between the period of 1998-2000 and 2001-2003, i.e., 3 years before each survey. It is interesting to note the similar decrease among TBT b.b. at Viana do Castelo harbour (Stn 2) and the 9% reduction in the commercial traffic between the two periods. Similarly, the TBT b.b. increase at Setúbal harbour (Stn 18) is coincident with a 57% rise in the commercial traffic. As mentioned above, change in commercial traffic is not the only cause for TBT b.b. variation. For instance, at Ria de Aveiro the commercial traffic increased only 3% but the change from 132 to 218 ng TBT-Sn g⁻¹ dry wt observed at Stn 10 is most likely related to the start of activity in 1999 of a new fishing port close to this site at Canal de Mira. Similarly, we can speculate that the consistent decrease of TBT b.b. at stations 14-16 in Lisbon is due to the closing of a major national shipyard at this harbour (Lisnave) in 2000, regardless the slight increase of the commercial traffic (0.7%) at this place. Many reasons can be speculated to explain the observed changes and rarely can we be sure of their veracity; hopefully, after the IMO ban there will be a global consistent decrease of TBT in all coast as the ban will affect all kinds of input sources, which will be easily detected through imposex and organotin b.b. monitoring.

Table 2.2. Time comparisons of *Nassarius reticulatus* imposex indices and organotin female body burdens (ng Sn/g dry wt), between 2000 (Barroso *et al.*, 2002) and 2003 (present survey), at common sites along the Portuguese coast. U: Mann-Whitney U-Test result; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ns: not significant; na: not analysed; nq: not quantifiable.

Station code	RPLI		FPLI				VDSI				%I		TBT		DBT		TPT	
	2000	2003	2000	2003	U	p	2000	2003	U	p	2000	2003	2000	2003	2000	2003	2000	2003
1	6.3	8.0	0.8	0.8	376.0	ns	2.5	2.7	362.0	ns	100	100	77	na	63	na	nq	na
2	92.1	85.1	11.5	7.5	14.0	***	4.5	4.9	322.0	*	100	100	1368	832	654	584	112	19
3	2.3	5.1	0.3	0.5	551.0	ns	1.7	2.2	454.0	*	81	100	37	na	37	na	nq	na
4	79.8	56.0	10.4	5.9	17.0	***	4.6	4.5	389.5	ns	100	100	481	330	205	169	18	nq
5	88.8	81.5	10.7	8.7	165	***	4.4	4.4	347.5	ns	100	100	602	na	354	na	84	na
6	10.7	3.0	1.3	0.3	76.5	***	2.5	1.3	219.5	***	100	68	55	na	44	na	nq	na
7	18.0	8.3	2.6	1.0	123.5	***	2.6	2.5	284.5	ns	94	100	66	63	49	32	nq	nq
8	59.8	59.4	7.2	6.1	274.0	**	4.3	4.2	413.5	ns	100	100	262	na	131	na	nq	na
9	13.8	24.5	1.8	2.5	221.0	*	2.7	3.0	255.5	ns	100	100	60	na	62	na	nq	na
10	58.2	47.1	7.0	5.5	195.5	ns	3.3	3.9	182.0	ns	100	100	132	218	81	61	nq	nq
13	88.1	90.0	8.5	6.7	72.5	***	4.9	5.0	221.0	ns	100	100	912	1679	671	1084	73	21
14	49.5	13.7	7.3	1.6	7.5	***	3.4	3.3	171.5	ns	100	100	90	39	103	23	nq	8
15	55.2	29.9	7.6	3.5	20.0	***	4.4	4.1	274.5	ns	100	100	128	48	121	35	15	12
16	88.1	67.4	7.7	7.0	242.0	ns	4.9	4.9	292.5	ns	100	100	488	400	275	103	23	8
17	85.9	78.7	7.9	9.4	158.5	*	4.9	4.3	126.0	**	100	100	459	na	413	na	52	nq
18	56.4	72.0	5.9	7.3	157.5	**	4.6	4.6	286.0	ns	100	100	124	185	90	143	20	16
19	1.2	2.2	0.1	0.3	536.5	ns	0.5	0.7	529.0	ns	26	36	23	na	nq	na	nq	nq
20	0.1	0.6	0.01	0.1	325.5	ns	0.6	0.4	246.0	ns	58	27	nq	na	nq	na	nq	nq
21	1.9	30.7	0.2	5.0	14.5	***	0.7	3.1	16.0	***	44	100	21	86	nq	30	13	<5
22	0	0.0	0.0	0.0	576.0	ns	0.0	0.0	576.0	ns	0.0	0.0	nq	na	nq	na	nq	nq

We checked also if the imposex evolution between 2000 and 2003 followed the same variation of the TBT b.b. in females for a given site. For that we used the regression equations and the plateau line of the relationships in Fig. 2.2 to estimate theoretical values of RPLI and VDSI for the TBT b.b. registered in both occasions and then we estimated the theoretical variation of these indices from 2000 to 2003. This variation was then compared with the observed difference of these indices for the same period [Table 2.4; Fig. 2.4]. Despite some rare exceptions, the theoretical and the observed variation between 2000 and 2003 had a common sign trend, i.e., they generally increase or decrease together, which means that imposex generally accompanied the evolution of the TBT concentration in the tissues.

When all stations are compared for imposex variation [Table 2.2] we conclude that in the majority of the sites the VDSI did not significantly differ between 2000 and 2003 and when there was a significant change it was either to increase or to decrease, depending on the site; the RPLI also increased in some sites and decreased in others. Hence, both indices presented some rises or reductions at a local scale but they did not reveal any global trend in the variation of TBT pollution in the Portuguese coast over the 3-year period.

Table 2.3: Commercial ship traffic activity in main Portuguese ports: total number of commercial ships called at each port during 1998-2003 expressed in terms of total gross tonnage stood (GTs).

	GTs ($\times 10^6$ T)					
	1998	1999	2000	2001	2002	2003
V. Castelo	0.92	1.13	1.19	1.15	0.93	0.87
Leixões	19.71	20.66	20.90	22.00	21.74	20.94
Aveiro	2.70	2.67	2.34	2.54	2.70	2.73
Lisboa	36.96	37.92	37.99	35.25	37.80	40.55
Setúbal	15.73	17.31	20.93	29.52	30.91	29.36

Table 2.4: Estimated and observed variations in RPLI and VDSI from 2000 to 2003.

Stations	RPLI (%)		VDSI	
	Theoretical	Observed	Theoretical	Observed
2	0.0	-7.1	0.0	0.4
4	-10.4	-23.8	-0.1	-0.1
7	-1.3	-9.7	-0.1	-0.1
10	13.9	-11.1	0.7	0.6
13	0.0	1.9	0.0	0.1
14	-23.2	-35.8	-1.1	-0.1
15	-27.2	-25.3	-1.3	-0.3
16	-5.5	-20.7	0.0	0.0
18	11.1	15.6	0.5	0.0
21	39.1	28.8	1.9	2.4

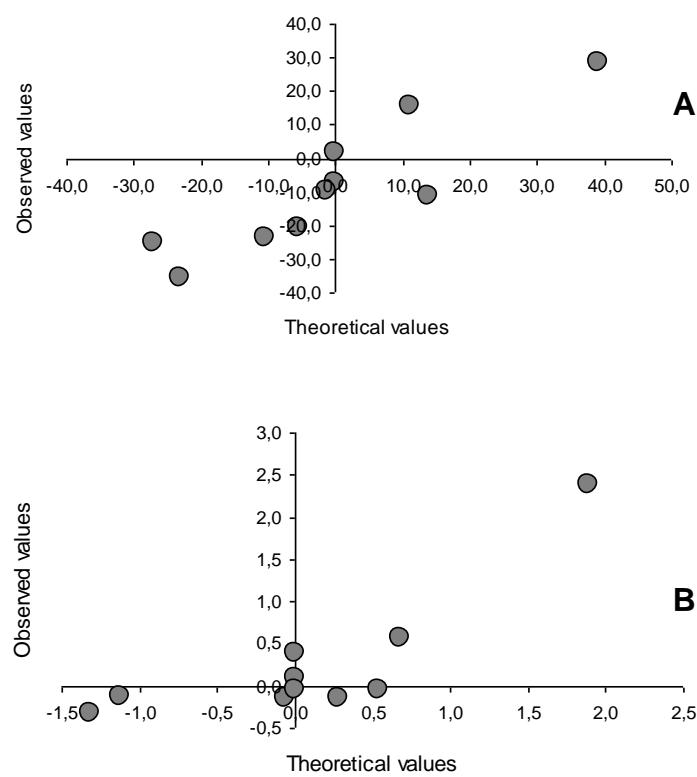


Figure 2.4: Relationship between estimated and observed variations in RPLI (A) and VDSI (B) from 2000 to 2003.

2.4. Discussion

There is evidence from laboratory experiments that imposex in *N. reticulatus* is induced by TBT, either administered by injection, by aqueous and sediment exposure or through the diet (Stroben *et al.*, 1992b; Bettin *et al.*, 1996; Pope, 1998; Barroso *et al.*, 2002). Further evidence of this relationship regards the high correlation found between imposex and TBT female b.b. in the current field survey; similar correlations were previously reported for the same area (Barroso *et al.*, 2002) and for the coastal waters of France (Stroben *et al.*, 1992), Britain (Bryan *et al.*, 1993) and Spain (Barreiro *et al.*, 2001). All these evidences point out the link of cause and effect between TBT contamination and the imposex in the netted whelk.

It is known that TBT acts as an androgenic endocrine disruptor that leads to the masculinization of the females (see review by Matthiessen and Gibbs, 1998; Oberdorster and Cheek, 2001). This masculinization varies between different species of prosobranchs but the common trend is the growth of a penis and a vas deferens over the female genital tract. This has been observed in *N. reticulatus* in previous works and was also shown in the current survey, since the RPLI and the VDSI were significantly correlated with TBT body burden. Barreiro *et al.* (2001) pointed out that females with advanced developed penis and vas deferens collected in NW Spain also exhibited a convoluted gonadal oviduct, resembling the sinuous seminal vesicle of the males. The current survey and the 2000 survey (Barroso *et al.*, 2002) showed the same pattern in the Portuguese coast, i.e., the convolution of the gonadal oviduct is correlated with VDSI and TBT b.b. and increases rapidly for $VDSI > 3$. Hence, oviduct convolution is most likely another masculinization effect of TBT pollution. Neither of the above mentioned effects seem to cause sterility in *N. reticulatus* females because they do not lead to vulva blocking or capsule gland malformation, as it happens with some other prosobranch species (Gibbs & Bryan, 1996). Nevertheless, sterility was found inside the harbours of Viana do Castelo (Stn 2) and Aveiro (Stn 12) in females with advanced imposex stages ($VDSI = 5$ and $AOS > 1$). Sterile females with advanced stages of imposex were also reported for the Portuguese coast by Barroso *et al.*

(2002) in 2000, although none was found at Aveiro. The consistency of these findings, together with very similar data reported for W France (Huet *et al.*, 1995) and NW Spain (Barreiro *et al.*, 2001), strongly suggests that sterilisation may be a consequence of imposex development. This may hypothetically result from any deformation that occurs inside the capsule gland that is not easily detected by visual inspection, which needs to be further studied. TBT pollution may thus have a stronger adverse impact on *N. reticulatus* populations than previously thought.

Hopefully, TBT pollution levels will reduce in the following years as a consequence of the application of the IMO ban in 2003. Under the scope of assessing the effectiveness of this ban in the future, we have created an updated baseline regarding the status of *N. reticulatus* organotin b.b. and imposex in 2003, which was described above in this paper. It showed the occurrence of increasing TBT b.b. and imposex levels with the proximity of harbours, which are identified as the hotspots of pollution in Portugal. At these areas many ships are anchored or being repaired or repainted at dockyards and high quantities of TBT are leached to the surrounding medium. This is easily detected in the TBT concentrations in the tissues. In fact, we registered a high mean level of about 600 ng Sn g⁻¹ dry wt of TBT b.b. inside or close to harbours and a value as high as 1679 ng Sn g⁻¹ was found at one port. These levels are similar to the ones observed for the same area in the 2000 survey (mean value of 580 ng Sn g⁻¹ (Barroso *et al.*, 2002). Comparison of *N. reticulatus* b.b. obtained in this study with those from other areas may be meaningful because pollution varies drastically with the choice of sampling sites and their distance to pollution sources. Nevertheless, the values reported in the present study are in the same order of magnitude as the ones reported by Barreiro *et al.* (2001) for the NW Spain, but are generally higher than the ones reported by Bryan *et al.* (1993) in the SW England. On the other hand, recent TBT inputs in the Portuguese coast are suggested by the ratio TBT*100/(TBT+DBT) with values varying between 56 and 80%. Such high levels have been reported for the 2000 survey (values between 34 and 63), Barroso & Moreira, 2002) and for the NW Spain in 1998 near hotspots of pollution (Ruiz *et al.*, 1998).

N. reticulatus exhibited also high levels of imposex inside harbours, where I% was 100% and the RPLI and VDSI were in average 69% and 4.5, respectively.

These values resemble those reported by other authors for the most polluted harbours of Spain (Barreiro *et al.*, 2001), France (Stroben *et al.*, 1992) and Britain (Bryan *et al.*, 1993). The high imposex and TBT female body burdens found in 2003 and the overhead content of TBT in comparison to its debutylated forms indicate that TBT paints are still largely used in the Portuguese coast. This is corroborated by the analysis of organotin and imposex evolution between 2000 and 2003 that indicates that there was no global change in the levels of TBT pollution. Moreover, when one attends to compare the relationships between imposex indices and TBT b.b. among the two surveys no differences as the ones recorded by Bryan *et al.* (1993) are observed, reinforcing the idea that no TBT decline occurred between 2000 and 2003. However, in the present survey the TPT levels were much lower (between 62 and 83% in Sts. 2, 4, 13, 16, 21 and 20% in Sts. 15, 18) than in 2000, which suggests a strong reduction of the input of this triorganotin. This can be derived either from a lesser usage of TBT as a co-toxicant in antifouling paints or from a diminishing application of TPT-based pesticides in agriculture.

For assessing the future impact of the IMO ban using *N. reticulatus* as a bioindicator, it is important to know if the species is in fact sensitive to track temporal changes in TBT pollution. Since TBT residues are lost from tissues with half times of about 2-3 months (OSPAR, 1998), this parameter can be used as a reliable tool for monitoring rapid changes in pollution. However, imposex in many prosobranch species has been considered an irreversible phenomenon so that if TBT pollution decreases the imposex will slowly decline as new mature whelks are recruited into the population. Considering that *N. reticulatus* can live for 15 years (Tallmark, 1980) and sexual maturation is achieved in about 4 years (Barroso, *pers. com.*), imposex monitoring would not detect rapid changes in TBT pollution. However, the current work showed that the variation of RPLI and the VDSI between 2000 and 2003 matched, in general terms, the evolution of the TBT female b.b. in the same period for most of the sites analysed. This suggests that the renovation of generations in the population may be faster than predicted or that imposex is, at least in part, reversible. Bryan *et al.* (1993) have already

noticed that a reduction in the netted whelk female penis length occur over time, but further research needs to find if the same applies to the VDSI.

References

- Alzieu C, Héral M, Thibaud Y, Dardignac MJ & Feuillet M (1981) Influence des peintures antisolaires à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. Revue des Travaux des Pêches maritimes 45: 101-116
- Barreiro R, González R, Quintela M & Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. Marine Ecology Progress Series 218: 203-212
- Barroso CM & Moreira MH (2002) 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 & Bebiano MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. Marine Ecology Progress Series 230: 127-135
- Bettin C, Oehlmann J, & Stroben E (1996) TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgoländer Meeresunters 50: 299-317
- Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE & Pascoe PL (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom 73: 913-929
- Fent K (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. Critical Reviews in Toxicology 26: 1-117
- Graham AFRS (1988) Molluscs: prosobranch and pyramidellid gastropods. In Kermack DM, Barnes SK (Eds) Synopses of the British Fauna, 2nd Ed. New Series N° 2. London: The Linnean Society of London and the Brackish-Water Science Association, pp. 186-189
- ten Hallers-Tjabbes CC, Wegener J-W, van Hattum B, Kemp JF, ten Hallers E, Reitsema TJ & Boon JP (2003) Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. Marine Environmental Research 55: 203-233

- Huet M, Fioroni P, Oehlmann J & Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. *Hydrobiologia* 309: 29-35
- Matthiessen P & Gibbs PE (1998) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 37-43
- Michel P, Avery B, Andral B, Chiffolleau J-F & Galgani F (2001) TBT along the coast of Corsica (Western Mediterranean): a persistent problem. *Marine Pollution Bulletin* 42: 1128-1132
- Minchin D, Stroben E, Oehlmann J, Bauer B, Duggan CB & Keatinge M (1996) Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Marine Pollution Bulletin* 32: 188-195
- de Mora SJ (1996) The Tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. In de Mora SJ (Ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge Environmental Chemistry Series 8, pp. 212-236
- Morgan E, Murphy J & Lyons R (1998) Imposex in *Nucella lapillus* from TBT contamination in South and South-West Wales: a continuing problem around ports. *Marine Pollution Bulletin* 36: 840-843
- Oberdorster E & Cheek OA (2001) Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environmental Toxicology & Chemistry* 20: 23-36
- OSPAR (1998) Joint Assessment and Monitoring Program (JAMP) - Guidelines for contaminant specific biological effects monitoring, Ref N° 1998-3
- Pope ND (1998) The bioavailability of sediment-bound tributyltin (TBT). Ph.D.Thesis, University of Plymouth, 258 pp.
- Quintela M, Barreiro R & Ruiz JM (2000) The use of *Nucella lapillus* (L.) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution. *The Science of The Total Environment* 247: 227-237
- Ruiz JM, Quintela M & Barreiro R (1998) Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): a possible effect of nearshore shipping. *Marine Ecology Progress Series* 164: 237-244
- 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
- Smith BS (1971) Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 377-378

Smith BS (1981) Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. Journal of Applied Toxicology 1: 15-21

Stroben E, Oehlmann J & Fioroni P (1992a) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. Marine Biology 113: 625-636

Stroben E, Oehlmann J & Fioroni P (1992b) *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropods tributyltin bioindicators. Marine Biology 114: 289-296

Szpunar J, Schmitt VO & Lobinski R (1996) Rapid speciation of butyltin compounds in sediments and biomaterials by CGC-MIP-AES after microwave-assisted leaching/digestion. Journal of Analytical Atomic Spectrophotometry 11: 193-199

Tallmark B (1980) Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. Marine Ecology Progress Series 3: 51-62

CAPÍTULO 3

Assessment of tributyltin (TBT) pollution in the NW Portuguese continental shelf using *Nassarius reticulatus* (L.) as a bioindicator

Abstract

Nassarius reticulatus (L.) was sampled between September and October 2002 at 366 sites located on the NW Portuguese continental shelf between Aveiro ($40^{\circ} 38.00$ N) and Oporto ($41^{\circ} 09.00$ N). The ranges of the surveyed depths varied from 3 to 34 m. Whelks were captured at 172 sites spread all over the study area. The imposex in this species was used as a biomarker of tributyltin (TBT) pollution. Females affected with imposex were found in 42% of the sites along the entire range of latitudes and depths, which indicate that TBT pollution is widespread over the study area. The percentage of females with imposex at each site varied between 0 and 36.4%, whereas the RPL and VDS indices ranged between 0-12.7% and 0-1.1, respectively. Some of the highest levels of imposex occurred 6-11 Km from the coast, at different latitudes, where depths are around 30 m. The spatial analysis of the imposex levels suggests that naval traffic, harbours, offshore anchorages and the sewage outfalls are the main TBT pollution sources in the area.

3.1. Introduction

Tributyltin (TBT) compounds have been used as biocides in antifouling paints since the 1960s (Bennet, 1996). TBT leaches from these paints into the water and accumulates in sediments and biota, causing several adverse effects in non-target organisms, particularly molluscs (Fent, 1990). One of the most world spread adverse effect is imposex - the superimposition of male characters onto prosobranch females (Smith, 1971). The imposex is a highly specific biomarker of

TBT pollution and is developed throughout the animal's life, providing a robust indication of global levels of organotin pollution at a given site. Although the impact of TBT on the inshore ecosystems has been fairly well studied over the last two decades, there is still little information regarding the offshore waters. It has been recently reported that some deep-sea species of bivalves, gastropods, cephalopods, crustaceans, echinoderms, fishes and mammals have measurable levels of TBT in their tissues (de Brito *et al.*, 2002a, 2002b; Takahashi *et al.*, 1998; Borghiand & Porte, 2002; Linley-Adams, 1999). In the case of gastropods is possible to disclose TBT tissue contamination by the assessment of the imposex levels even if contamination is below chemical detection. Hence, this biomarker is an essential tool for monitoring TBT pollution in offshore areas where TBT levels are generally very low. Ten Hallers-Tjabbes and co-workers (1994) reported for the first time the occurrence of imposex in offshore gastropod populations of *Buccinum undatum* in the North Sea. Similar findings were later reported for the gastropods *Bolinus brandaris*, *Hexaplex trunculus* and *Thais haemastoma* in the Mediterranean Sea (Gómez-Ariza *et al.*, 1999; Morabito *et al.*, 1999), *Cassidaria tyrrhena*, *Colus gracilis*, *Cymbium olla* and *Bolinus brandaris* along the Atlantic Iberian coast (Boon, 2001) and *Neptunea antiqua* in the North Sea (ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 2003). These species are very scarce or absent in Portuguese waters.

The netted-whelk *Nassarius reticulatus* exhibits a wide geographical distribution that extends from the Canaries and Azores north to Norway and throughout the Mediterranean and Black Seas (Fretter & Graham, 1984). It has been successfully used in TBT biomonitoring programs around Europe (Bryan *et al.*, 1993; Oehlmann *et al.*, 1993; Barroso *et al.*, 2000; Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2002) and was recommended as a key species for organotin biomonitoring in the inshore coasts of the maritime area covered by the OSPAR Convention (Convention for the Protection of the Maritime Environment of the North-East Atlantic). However, there is no data regarding its use for surveying offshore areas. This species is a ubiquitous gastropod species in the Portuguese mainland coast, it is commonly found at sandy sheltered places of rocky intertidal areas along the seashore, being particularly abundant in sandy or muddy

sediments inside estuarine systems (Barroso *et al.*, 2002). This whelk has been occasionally found in the NW Portuguese continental shelf up to a depth of 100 m (Rodrigues & Quintino, *pers. commun.*)

The objectives of the present work are to assess the status of TBT pollution in the NW Portuguese continental shelf and to evaluate the usefulness of *N. reticulatus* as a bioindicator in offshore European waters.

3.2. Materials and methods

The study area is the NW Portuguese continental shelf comprised between Oporto ($41^{\circ} 09.00$ N, 46.08 W) and Aveiro ($40^{\circ} 38.00$ N, 50.11 W), up to a depth of 34 m. Sampling was carried out between 11 September and 1 October 2002 along 63 transects perpendicular to the coast. In each transect the distance between sampling stations varied between 0.3 and 2.4 Km according to the topography. Six to seven stations were allocated in each transect between the bathymetric lines of 3 and 34 m [Fig 3.1]. At each site the sampling consisted of 5 min towing performed by 2 dredges positioned on both sides of the boat. Each dredge was 0.64 m width and carried a net bag of 35 mm mesh size. The total area surveyed at each site was about 140 m^2 . The sediment type was qualitatively assessed at each site. *Nassarius reticulatus* specimens were selected and samples were frozen and kept at -20°C until analysis.

Only adult animals (i.e. those presenting white columellar callus and teeth on the outer lip) were selected for imposex analysis. The shell height (distance from shell apex to lip of siphonal canal) was measured with vernier callipers to the nearest 0.1 mm. The shells were cracked open with a bench vice, and individuals were sexed and dissected under a stereo microscope. The penis length was measured using 1 mm graduated graph paper under a stereo microscope. The relative penis length index (RPLI= mean female penis length x 100/mean male penis length), the vas deferens sequence index (VDSI) and the percentage of females affected by imposex (% I) were determined for each station. The RPSI values refer to animals that were previously frozen and so cannot be directly

compared with those reported in other works for live animals. The VDSI was classified according to the scoring system proposed by Stroben *et al.* (1992).

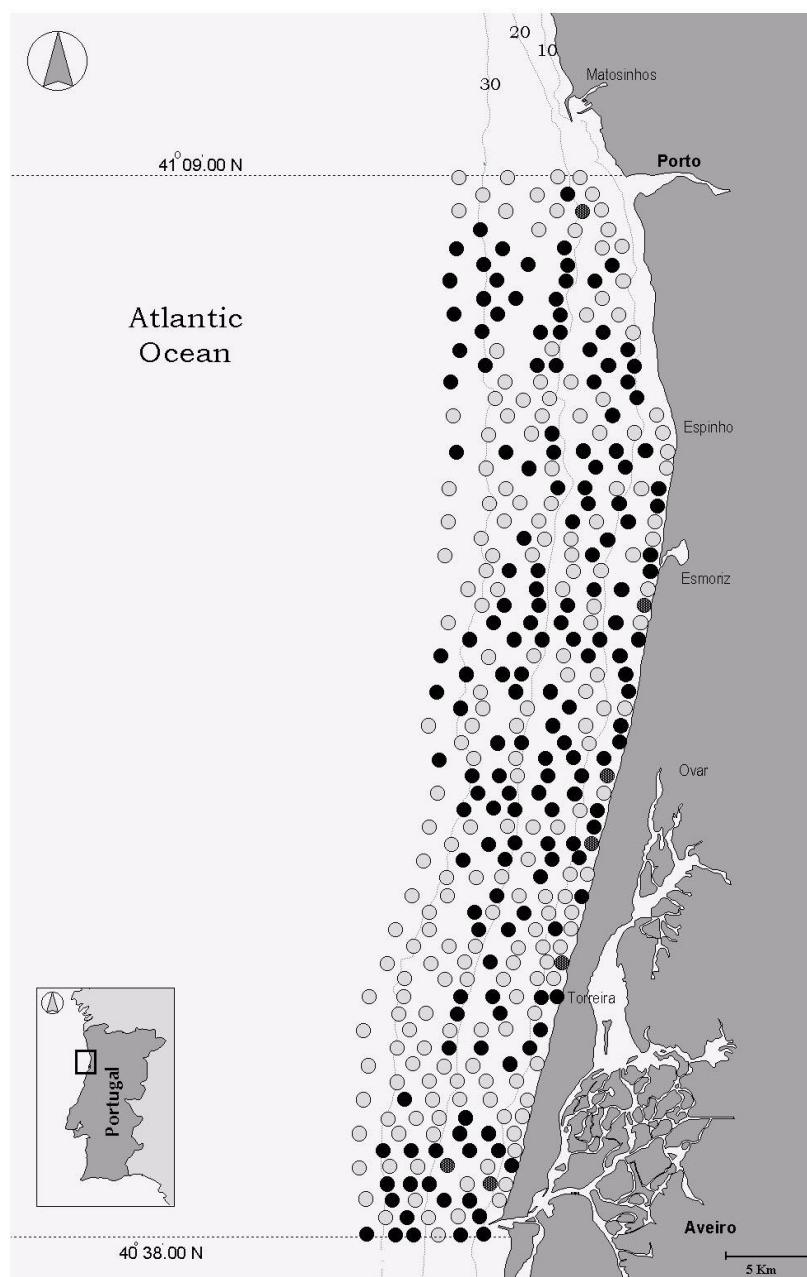


Figure 3.1. *Nassarius reticulatus*. Location of the sampling sites (circles) with the indication where specimens were collected (black circles).

3.3. Results

3.3.1. *Nassarius reticulatus* distribution

Nassarius reticulatus (L.) was captured at 172 of the 366 sampling sites. These sites were dispersed over all the surveyed area at all depths. They were scarce or absent especially at stations off Foz do Douro (Oporto) and at higher depths off Torreira [Fig 3.1]. At those sites were found many empty shells inhabited by hermit crabs. A total of 4762 specimens were collected among the 172 sites. Adult females (2014) were present in 165 sampling sites and represented 43% of the total number of animals caught [Fig 3.2].

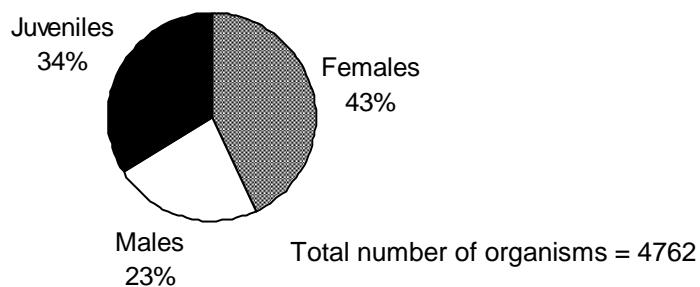


Figure 3.2. *Nassarius reticulatus*. Relative proportions of juveniles, females and males collected in the study area.

3.3.2. *Nassarius reticulatus* imposex

Females affected with imposex were present on the entire surveyed area. They were captured in 55 of the 165 sites where adult females were collected, meaning that imposex occurred in 1/3 of the sites where females were caught. However, it was decided to select only those sites where more than 5 adult females were collected to account for the robustness of the results. According to this criterion only 125 sites were selected. Imposex was found in 52 of these sites representing an imposex incidence of 42%. As these sites were dispersed along

the entire range of latitudes and depths this represents an important overall impact of the TBT pollution in the NW Portuguese continental shelf. Figure 3.3 summarizes the *N. reticulatus* imposex levels and the location of potential sources of contamination. At each station the percentage of affected females (%I) varied between 0 and 36.4%, the RPL index between 0 and 12.7% and the VDS index between 0 and 1.1. Although imposex was present throughout the entire sampled area its intensity was low. Of the 2014 females analysed only 8 showed a *vas deferens* well developed and reaching the vulva (VDS stage 4); 100 females exhibited a VDS stage 3 (5 of those presented the alternative b-way); no females with VDS stage 2 were found but 9 females exhibited VDS stage 1. The low frequency of VDS stages 1 and 2 may be associated to the fact that these stages are more difficult to detect in non-living animals, suggesting that the imposex incidence in the study area may be even higher than that estimated here.

Comparing the data obtained for *N. reticulatus* populations in the inshore Portuguese coast (Barroso *et al.*, 2002) the highest imposex levels observed in the study area correspond to TBT body burdens that are below or very close to analytical detection limits.

The spatial distribution of imposex suggests the existence of 4 major areas of TBT pollution. Two of these areas are quite evident and are located south of Oporto and off Aveiro. The other two areas can be found near Esmoriz and near Torreira.

To allow a more robust spatial analysis we increased the number of females per unit area by grouping the sampling stations into quadrats of c.a. 10 km² [Fig 3.4]. With this new approach it is still possible to establish two main contaminated areas near Oporto and Aveiro. The imposex levels obtained in each quadrat varied between 0-30% for %I, 0-8.8% for RPLI and 0-0.9 for VDSI.

There was no trend between the imposex indices %I, RPLI and VDSI and the type of sediment across sampling sites, which consisted mainly of sand, pebbly sand and sandy gravel.

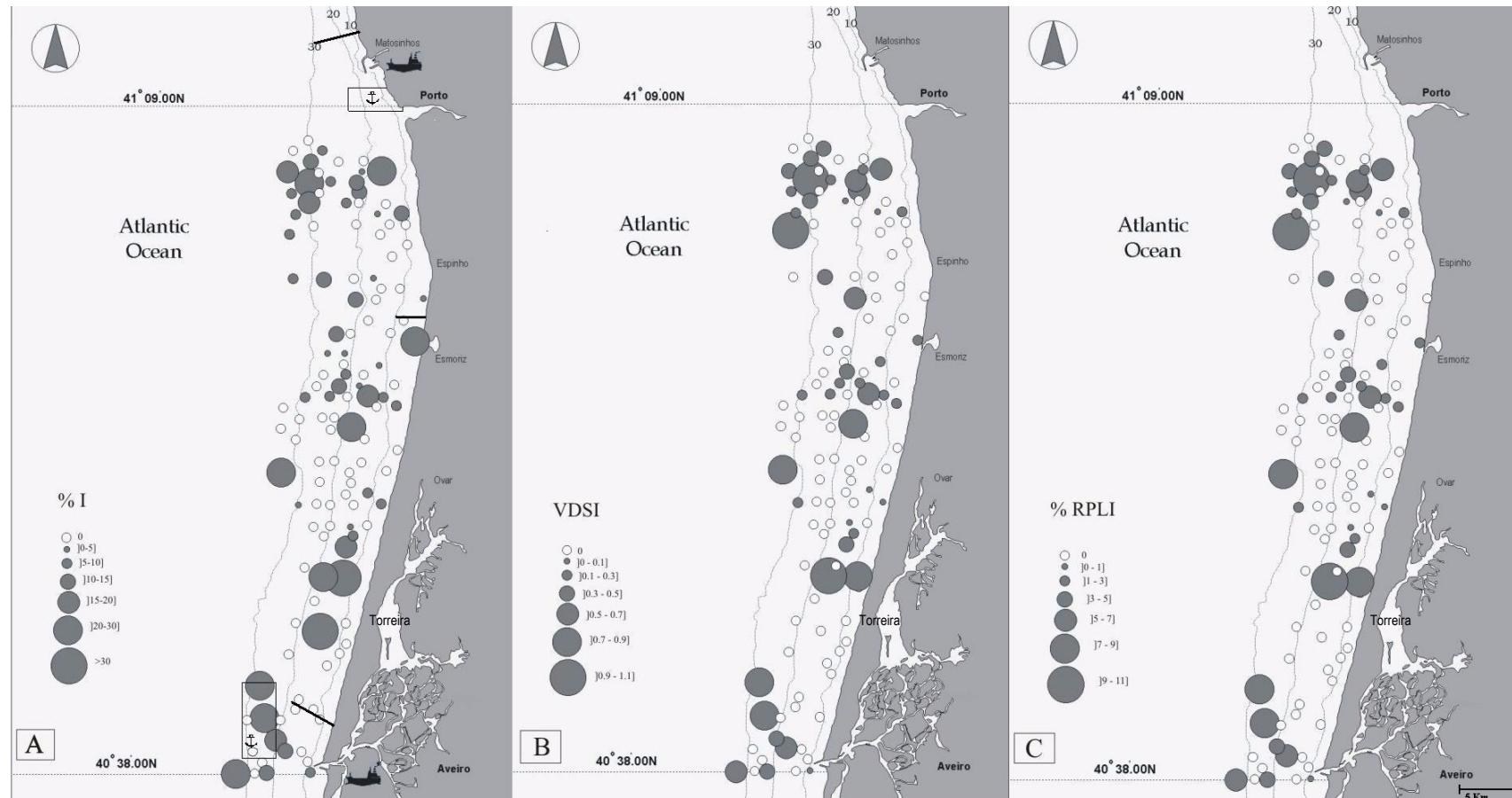


Figure 3.3. *Nassarius reticulatus*. Imposex intensity levels found in the study area, (A) %I: percentage of females affected by imposex, (B) VDSI: vas deferens sequence index, (C) RPLI: relative penis length index. Location of potential sources of contamination, the rectangle with an anchor corresponds to anchorage sites, the dark line to sewage outfalls and the boat represents harbours. The shipping route in the Portuguese coast is about 80 Km away from the coastline, being therefore out of the limits of the surveyed area.

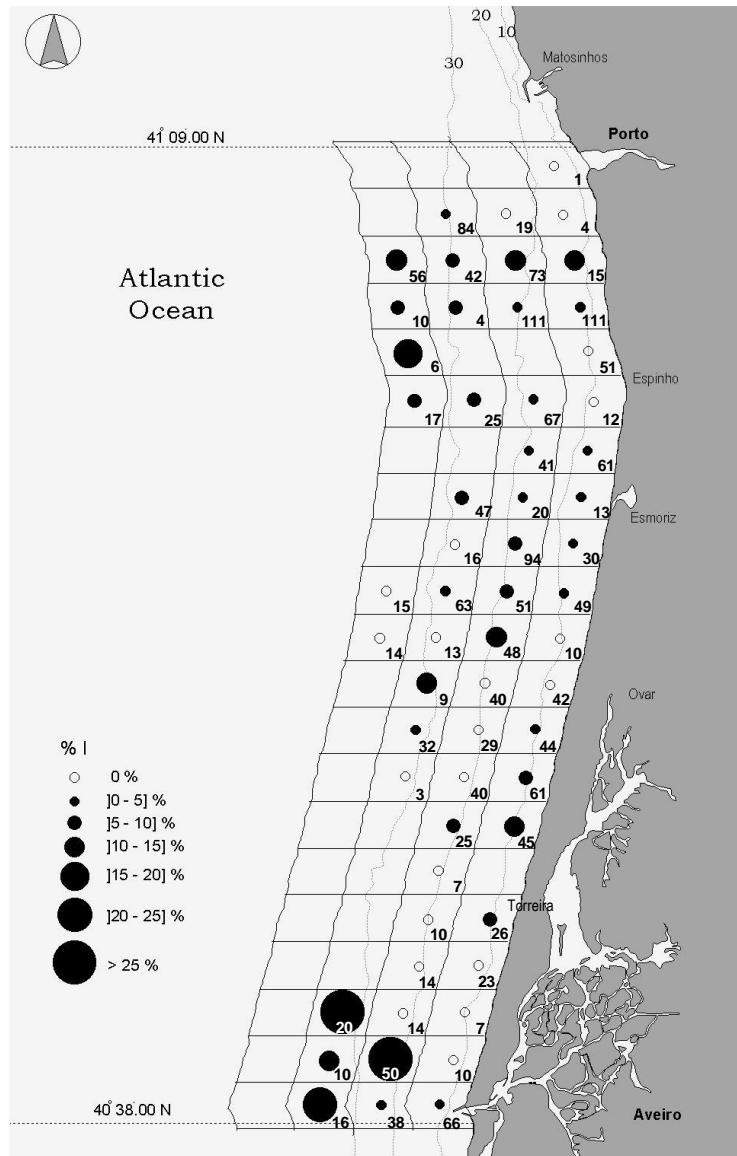


Figure 3.4. *Nassarius reticulatus*. Percentage of affected females (%I) in the study area after grouping the stations into quadrats of approximately 10 km². The number of females analysed is indicated in the right-bottom of each quadrat.

3.4. Discussion

Imposex surveys in the offshore are frequently impaired by the scarce number of specimens collected, which may lead to meaningfulness conclusions. It was found that *Nassarius reticulatus* was a common species in the NW Portuguese Continental shelf. This fact, associated with an intense sampling effort,

allowed the collection of a reasonable number of specimens that provided valuable information regarding the level of TBT pollution in the studied area. The imposex levels observed in the present survey indicate that TBT pollution is diffuse and is spread over most of the area. The reproductive capability of *N. reticulatus* populations is not affected since the imposex levels were generally low and did not lead to female sterilization. However, females with imposex occurred in 42% of the sites. Moreover, 20-30% of the females exhibited imposex at sites located 6-11 Km off the coasts of Aveiro, Oporto and Torreira/Esmoriz at depths that reached 30 meters. At these areas imposex values were: $I \approx 20-30\%$, VDSI ≈ 1 and RPLI $\approx 10\%$. A sample VDSI of around 1 in this species is indicative of a TBT water contamination of about of $0.8 - 2.0 \text{ ng Sn L}^{-1}$ (Huet et al., 1995). This value is above the saltwater chronic criterion determined by the U.S. Environmental Protection Agency for TBT, which was set in 0.4 ng Sn L^{-1} (U.S. EPA, 2002). The impacts of this pollution level on the offshore ecosystems are difficult to gather since most of the toxicological studies for TBT regard the inshore coast species. Nevertheless, the NOEL “no observed effect levels” proposed by Alzieu & Michel (1998) show that planktonic organisms and molluscs are likely to be the most affected: $<0.5 \text{ ng Sn L}^{-1}$ for imposex in gastropods, 0.5 ng Sn L^{-1} for phyto- and zooplankton growth, 0.7 ng Sn L^{-1} for oyster (*Crassostrea gigas*) calcification anomalies. In European inshore coasts *N. reticulatus* is viewed as a moderate sensitive species (Huet et al., 1995) so if it presents a VDSI ≈ 1 at a given site it means that some other more sensitive local gastropods such as *Ocinebrina aciculata*, *Nucella lapillus* and *Ocenebra erinacea* (Huet et al., 1995; Gibbs & Bryan, 1996; Oehlmann et al., 1996; Barroso et al., 2002) may exhibit imposex stages close to sterilization. By comparison, more sensitive species that live in the NW continental shelf may be more affected than *N. reticulatus*. The gastropods that cohabit the NW Portuguese continental shelf, besides *N. reticulatus*, are *Aporrhais pespelecani*, *Natica alderii*, *N. catena*, *Colus gracilis*, *Neptunea antiqua*, *Acteon tornatilis*, *A. augustoi*, *Bela* sp., *Euspira nitida*, *Mangelia* sp., *Phininea aperta*, *Ondina vitrea*, *Vitreolina* sp. and *Retusa truncatula* (Rodrigues & Quintino, pers. commun.; Freitas et al., 2003). Imposex has not been studied in these

particular species but eventually some of them may be more sensitive and more adversely affected than *N. reticulatus*.

The study area is under the influence of the Leixões (Oporto) and Aveiro harbours, which are known to be important sources of TBT pollution (Barroso *et al.*, 2002). The sub-surface TBT water contamination in those harbours may reach 79.9 ng Sn L⁻¹ in Leixões and 29.9 ng Sn L⁻¹ in the Ria de Aveiro (Barroso, unpublished data). Moreover, the percentage of *N. reticulatus* females with imposex in those harbours is generally about 100% and the VDSI is around 4.4-4.5 and 2.5-4.6, respectively (see chapter 2 of the present dissertation). This explains why the stations located near by Oporto and Aveiro registered high levels of imposex. However, it is interesting to note that at Aveiro the imposex intensity increases with depths >20 m and with the distance to the coast (> 5 Km). This fact is explained by other TBT inputs such as anchorage sites that are located between 4 and 6 km from the mouth of Ria de Aveiro [Fig 3.3]. They represent a source of contamination given that a single ship at anchor for three days in a particular area can leach more than 200 g of TBT into the water (Batley, 1996). Another possible source of contamination is the discharge of sewage by submarine outfalls. There are several outfalls in the study area: S. Jacinto outfall that extends 3.3 Km from the coast and at a depth of 17 m; Matosinhos outfall that extends 2.8 Km from the coast and at a depth of 30 m and Espinho outfall that extends 2.0 Km from the coast and at a depth of 8.4 m. The discharged sludge is the result of municipal and industrial wastewater. Municipal wastewater may give rise to an organotin input into the aquatic system. In a study performed at raw municipal wastewater in Zurich the concentrations of TBT were in the order of 26.6-90.2 ng Sn L⁻¹ and after secondary and tertiary treatment they were 0.4-7.0 ng Sn L⁻¹ (Fent, 1996). The intense traffic of ships, especially fishing boats, between Oporto and Aveiro, also causes a generalized input of TBT in the surveyed area.

It may be concluded that the studied area in the NW Portuguese Continental shelf is extensively affected by TBT pollution. Although this pollution is widespread, major spots of pollution can be identified. These spots are hypothetically associated with TBT inputs derived mainly from naval traffic, harbours, ship anchorages and sewage outfalls. *N. reticulatus* proved to be a

suitable bioindicator for the surveyed area and should be further used in future monitoring surveys in offshore areas.

References

- Alzieu C & Michel P (1998) L'étain et les organoétains en milieu marin: biogéochimie et ecotoxicologie. Repères Océan, Edit IFREMER 15: 104 p
- Barreiro R, González R, Quintela M & Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. Marine Ecology Progress Series 218: 203-212
- Barroso CM, Moreira MH & Bebiano MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese Coast. Marine Ecology Progress Series 230: 127-135
- Barroso CM, Moreira MH & Gibbs PE (2000) Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a Southern Europe estuarine System (Ria de Aveiro, NW Portugal). Marine Ecology Progress Series 218: 221-232
- Batley G (1996). The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In de Mora SJ (Ed.) Tributyltin: case study of an environmental contaminant Cambridge: Cambridge University Press, pp. 139-162
- Bennet RF (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In de Mora SJ (Ed.) Tributyltin: case study of an environmental contaminant Cambridge: Cambridge University Press, pp. 21-61
- Borghiand V & Porte C (2002) Organotin pollution in deep-sea fish from the Northwestern Mediterranean. Environmental Science and Technology 36 (20): 4224-4228
- Boon JP (2001) Action to demonstrate the harmful impact of TBT, effective communication strategies between policy makers and scientists in support of policy development (HIC_TBT). Final Report. Life 98 En/NI//000199
- de Brito APX, Takahashi S, Ueno D, Iwata I, Tanabe S & Kubodera T (2002) Organochlorine and butyltin residues in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) from Bering Sea, Gulf of Alaska and Japan Sea. Chemosphere 46: 401-411
- de Brito APX, Ueno D, Takahashi S & Tanabe S (2002) Organochlorine and butyltin residues in deep-sea organisms collected from the western North Pacific, off-Tohoku, Japan. Marine Pollution Bulletin 45 : 348-361

- Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE & Pascoe PL. (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom 73: 913-929
- Fent K (1990) Ecotoxicology of organotin compounds. Critical Reviews in Toxicology 26: 1-117
- Fent K (1996) Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. The Science of the Total Environment 185: 151-159
- Freitas R, Rodrigues AM & Quintino V (2003) Benthic biotopes remote sensing using acoustics. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 286: 339-353
- Fretter V & Graham A (1984) British prosobranch molluscs, their functional anatomy and ecology Dorchester: Dorset Press, pp. 522-524
- Gibbs PE & Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In de Mora SJ (Ed.) Tributyltin: case study of an environmental contaminant Cambridge: Cambridge University Press, pp. 212-236
- Gómez-Ariza JA, Velasco A, Morales E, Giradles I, Santos M & ten Hallers-Tjabbes CC (1999) Study about the impact of TBT in the South West Coast of Spain. Occurrence of imposex in *Bolinus brandaris*. In MEPC 44/INF.11, submitted by Spain
- ten Hallers-Tjabbes CC , Kemp JF & Boon JP (1994) Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North-Sea: relation to shipping traffic intensities. Marine Pollution Bulletin 28: 311-313
- ten Hallers-Tjabbes CC, Wegener J-W, van Hattum B, Kemp JF, ten Hallers E, Reitsema TJ & Boon JP (2003) Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. Marine Environmental Research 55: 203-233
- Huet M, Fioroni P, Oehlmann J & Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. Hydrobiologia 309: 29-35
- Linley-Adams G (1999) The accumulation and impact of organotins on marine mammals, seabirds and fish for human consumption. Report for WWF-UK Project N° 98054
- Morabito R, Gianguzza P, Vizini T, Reas G, Nicolai P, Gianguzza A & ten Hallers-Tjabbes CC (1999) Impact of TBT off Sicily. In MEPC 44/INF.11, submitted by Italy
- Oehlmann J, Stroben E & Fioroni P (1993) Fréquence et degré d'expression du pseudohermaphrodisme chez quelques prosobranches sténoglosses des côtes françaises (surtout de la baie de Morlaix et de la Manche) 2. Situation jusqu'au printemps de 1992. Cahiers de Biologie Marine 34: 343-362

- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E & Markert B (1996) Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *The Science of the Total Environment* 188: 205-223
- Smith BS (1971) Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 377-378
- 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
- Takahashi S, Lee J-S, Tanabe S & Kubodera T (1998) Contamination and specific accumulation of organochlorine and butyltin compounds in deep-sea organisms collected from Suruga Bay, Japan. *The Science of the Total Environment* 214: 49-64
- U.S. EPA. (2002) Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT). EPA-822-B-02-001, Washington, DC

CAPÍTULO 4

**Acute toxicity of tributyltin (TBT) to veliger larvae
of *Nassarius reticulatus* (L.)**

Abstract

The acute toxicity of tributyltin (TBT) to the veliger larvae of the mollusc gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) was assessed. Recently hatched veligers were exposed to nominal concentrations of 900, 1400, 1900, 2800, 3800, 4700 and 5600 ng TBT-Sn (ng Sn L^{-1}) for 96 hours, under static conditions ($17^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ and $33 \pm 1 \text{ psu}$). The percentage of larval mortality was determined for each TBT concentration and exposure time (1, 24, 48, 72 and 96 hours). TBT had a highly significant effect on the survival of larvae ($p < 0.001$) for all times of exposure, except for the first hour. The Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) decreased over time from 3800 ng Sn L^{-1} at 24h to 1900 ng Sn L^{-1} at 96 h. The median lethal concentration (LC_{50}) showed the same pattern, decreasing from 4870 ng Sn L^{-1} at 24h to 1780 ng Sn L^{-1} at 96 h. For short time exposures the range of concentrations that reduce larval survival is notoriously higher than the ones reported for TBT environmental levels.

4.1. Introduction

Tributyltin (TBT) compounds have been extensively used in the last four decades as biocides in antifouling paints, which gave forth to a new pollution problem around the world. TBT is extremely toxic to a variety of non-target organisms (Alzieu, 2000). One widespread adverse effect of this pollutant is the masculinization of gastropod prosobranch females, a phenomenon coined as imposex by Smith (1971). Imposex is already described for 150 different species around the world and may lead to female sterility at highly polluted sites

(Matthiessen & Gibbs, 1998). A severe ecological impact may be expected in species that lack a planktonic stage in their life cycle since if no recruitment of young specimens occurs from other places the population will become extinct. This has happened, for instance, with the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) at many sites of the Atlantic coasts (Gibbs & Bryan, 1996; Barroso & Moreira, 2002; Ruiz *et al.*, 1998). It is generally assumed that populations of species with planktonic stages in their life cycle will not be severely affected by female sterilisation as the supply of new individuals is always assured from other less polluted places. However, TBT is extremely toxic and lethal to mollusc larvae, which are more sensitive than the adults (Thain, 1983). Hence, more research should be addressed regarding the effects of TBT pollution on the recruitment of prosobranch species at highly polluted sites. Most of the studies regarding the toxicity of TBT towards mollusc larvae have been performed on bivalves, such as *Scrobicularia plana* (Ruiz *et al.*, 1995a, 1995b, 1995c), *Crassostrea gigas* (Geffard *et al.*, 2001; Beiras *et al.*, 2003; His *et al.*, 1997, 1999; Labare *et al.*, 1997), *Mytilus edulis* (Lapota *et al.*, 1993; Beaumont & Budd, 1984) and *Mytilus galloprovincialis* (Geffard *et al.*, 2001; His *et al.*, 1997). Curiously, very few ecotoxicological studies are available regarding gastropod larvae (Horiguchi *et al.*, 1998).

The netted whelk *Nassarius* (=*Hinia*) *reticulatus* (L.) is a common European prosobranch gastropod that is distributed from the Black Sea and the Mediterranean, north to Norway and into the western Baltic (Graham, 1988). *N. reticulatus* has an indirect development: females lay capsules containing approximately 50-350 eggs between spring and summer and after 2-4 weeks veligers hatch from the capsule to start a planktonic phase of 1-2 months before settling (Tallmark, 1980; Fretter & Graham, 1994; Barroso & Moreira, 1998). This species is affected by imposex at hotspots of pollution throughout Europe (Stroben *et al.*, 1992; Bryan *et al.*, 1993; Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2000, 2002), and female sterility has been reported for highly polluted sites. The aim of the present work is to assess the acute toxicity of TBT on the survival of veliger larvae of *N. reticulatus* and to evaluate if the recruitment of this species might be affected at hotspots of pollution.

4.2. Methods

4.2.1. Bioassay procedure

Nassarius reticulatus capsules were collected at Ria de Aveiro (NW Portugal) in September 2003. The capsules were mainly attached to the algae *Laurencia pinnatifida* so that algae containing capsules were collected and brought to the laboratory. The algae with capsules were then maintained at $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in 250 ml beakers containing natural seawater (33 psu) permanently aerated. Each capsule was daily monitored under a stereo microscope and those "close to hatch", i.e., containing veliger larvae with developed eyes, pigmentation, statocysts and beating velum, were teared and larvae were collected with a micropipette. The test was started by adding approximately 8-10 recent hatched larvae to each 2 ml well containing 1.5 ml of test solution. Each treatment, including the control, was replicated twelve times yielding a total of ca 100 larvae. No food was supplied. All the material was subjected to a previous acid bath in order to prevent adsorption of TBT. Temperature ($17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), salinity (33 psu) and darkness were maintained constant and no renewal of test solutions was performed during the experiment. Salinity was similar to that occurring at the site where the capsules were collected. Numbers of live and dead larvae were counted every 24 hours under a stereo microscope between the first hour and the fourth day of the experiment. Live larva were those actively swimming in the water or lying on the bottom but beating the velum.

4.2.2. Test solutions

TBT chloride ($\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{ClSn}$) (Fluka) solutions were prepared with filtered natural seawater ($\text{TBT} < 30 \text{ ng Sn L}^{-1}$) at nominal concentrations of 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 and 6000 ng Sn L^{-1} . To improve the solubility of TBT in seawater an organic solvent, dimethyl sulfoxide (DMSO), was used to add TBT into the test solutions. Therefore two controls were used, one with seawater and

other with seawater plus DMSO. The DMSO control received the same quantity of solvent as the treatments ($150 \mu\text{L}^{-1}$).

In our calculations we incorporated ca 6.67% dilution of the nominal concentrations caused by adding 0.100 mL of larval suspension in the 1.500 mL of test solutions. Therefore, the larvae were exposed to the following concentrations: 900, 1400, 1900, 2800, 3800, 4700 and 5600 ng TBT-Sn (ng Sn L $^{-1}$). The short duration of the tests and the low light intensity ensured that the degradation of TBT during the experiment was negligible.

2.3. Statistical analysis

The mean percentage of dead larvae and standard deviation were calculated for each treatment at 1, 24, 48, 72 and 96 hours and compared with the DMSO control. One-way ANOVA followed by *post hoc* Student Newman Keuls test (SNK, $\alpha = 0.05$) was performed in order to test the null hypothesis that TBT had no effect upon larval survival. The transformation $\text{arcsin}\sqrt{x}$ was applied to the data prior to the analysis, and variances of data were checked by means of Cochran's homogeneity test before running ANOVA (Zar, 1996).

The No Observed Effect Concentration (NOEC) and the Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) values were determined from the larval mortality data after using ANOVA and *post hoc* Student Newman Keuls test. NOEC was defined as the highest concentration causing no significant mortality on larvae whilst LOEC was defined as the lowest concentration causing significant mortality of larvae (Reichelt-Brushett & Harrison, 2000; Fernandez & Beiras, 2001). The LC $_{50}$ (Median Lethal Concentration) values, i.e., concentrations causing 50% of mortality, and their confidence limits were calculated using the PROBIT ANALYSIS (Finney, 1971).

3. Results

There was no significant difference on mortality observed in the seawater and the DMSO controls up to 96h (Student Newman Keuls test, $\alpha = 0.05$). The average mortality in the control was always lower than 20%, except for 96 h where mortality reached 24.7%. Mortality values superior to 30% in the control group are unacceptable for a valid OEL (Oyster Embryo Larval Test) according to ASTM (1998) protocols, nonetheless other authors (His *et al.*, 1997, 1999) recommend that a test should be rejected if mortality in the control is higher than 20%. The mortality in the control group for 96 h ranged between the aforementioned values, so this data should be cautiously analysed.

TBT had a highly significant effect on the survival of *N. reticulatus* larvae ($p < 0.001$) for all times of exposure, except for the first hour [Table 4.1]. A highly significant increase of mortality occurred at a TBT concentration as low as 1900 ng Sn L⁻¹ for 96 h, comparing to the control. Higher tributyltin concentrations caused significant effects for lower exposure times; for instance, TBT \geq 3800 ng Sn L⁻¹ induced mortality from 24 h onwards [Figure 4.1]. The estimated values for NOEC, LOEC and LC₅₀ are shown in Table 4.1. The NOEC and the LOEC decreased over the time of exposure: for 24h they were 2800 and 3800 ng TBT-Sn L⁻¹, respectively; whereas for 96h they were 1400 and 1900 ng TBT-Sn L⁻¹. The LC₅₀ values also decreased with the time of exposure from 4870 ng TBT-Sn L⁻¹ (at 24 h) to 1780 ng TBT-Sn L⁻¹ (at 96h).

Table 4.1. Parameters of One-Way ANOVA testing the effects of TBT concentrations on the percentage of dead larvae of *Nassarius reticulatus* at different times of exposure and respective NOEC, LOEC, LC₅₀ and LC₅₀ 95% confidence intervals. F: ***p<0.001, ns: p>0.05, df: degrees of freedom.

Time	df	F	TBT-Sn (ng Sn L ⁻¹)			
			NOEC	LOEC	LC ₅₀	95% CI
1 h	8	1.55 ns	-	-	-	-
24 h	8	53.57***	2800	3800	4870	3677-6067
48 h	8	110.05***	1900	2800	3590	3137-4028
72 h	8	146.73***	1400	1900	2500	1294-3721
96 h	8	105.02***	1400	1900	1780	1436-2123

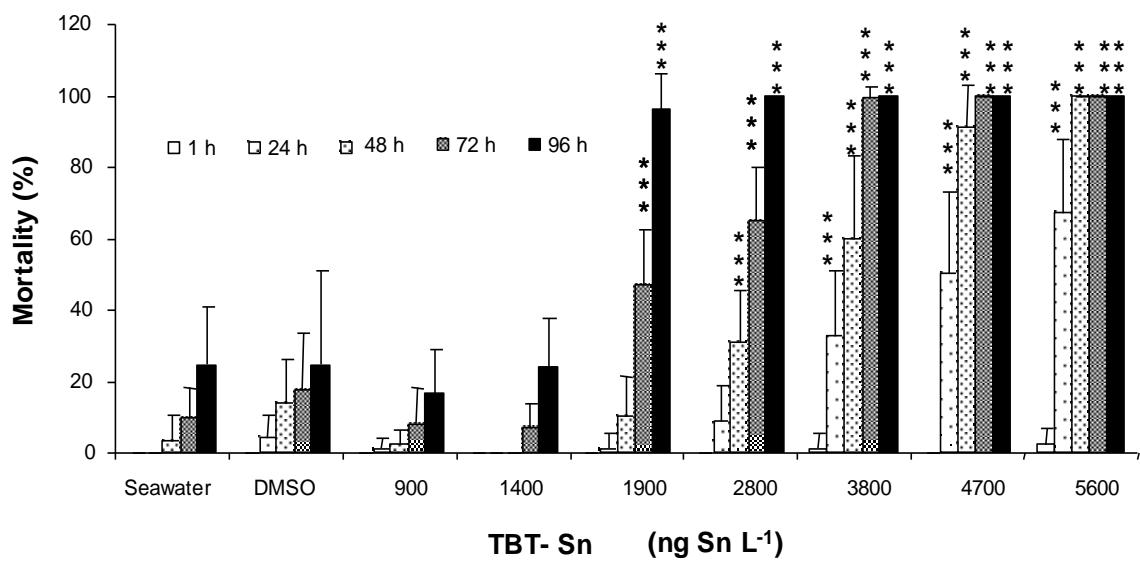


Figure 4.1. Percentages of dead *N. reticulatus* larvae in relation to different concentrations of TBT throughout the experimental period. Error bars represent the standard deviation for each concentration (n=12). Concentrations where significant increasing mortality in relation to the DMSO control occurred are marked: ***p<0.001 (Student Newman Keuls test, $\alpha = 0.05$).

4. Discussion

Few studies have measured TBT effects on larval survival in gastropods and, as far as we know, this is the first one reporting the effects of this compound on *Nassarius reticulatus*. Our results disclose LC₅₀ varying from 4870 ng TBT-Sn L⁻¹ at 24h to 1780 ng TBT-Sn L⁻¹ at 96h on recently hatched veliger of this species. The LC₅₀ (48 h) of 3590 ng TBT-Sn L⁻¹ obtained in the current study is, in general, higher than the ones reported for acute toxicity tests with gastropod and bivalve larvae. For gastropod larvae of *Thais clavigera*, *Haliotis discus discus* and *Haliotis madaka* the reported values for LC₅₀ (48 h) are 2295, 2213 and 492 ng TBT Sn L⁻¹, respectively (Horiguchi *et al.*, 1998). For bivalve larvae of *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* the LC₅₀ (48 h) values are 943, 1638 and 676 ng TBT-Sn L⁻¹, respectively (Thain, 1983; Roberts, 1987). LC₅₀ (48 h) of 1000 ng TBT-Sn L⁻¹ were reported for *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* larvae (Robert & His, 1981 *in* Ruiz *et al.*, 1995c).

The major conclusion derived from the present work is that TBT has a highly significant effect on the survival of *N. reticulatus* larvae. The lowest LC₅₀ and LOEC obtained in the current study at 96 h (respectively, 1780 and 1900 ng TBT-Sn L⁻¹ ng) are above the typical TBT water concentrations generally found in the open waters of estuaries - between 4 and 40 ng Sn l⁻¹ (Bryan and Gibbs, 1991); they are also higher than the common concentrations reported for dockyard and ports - 100 to 200 ng Sn l⁻¹ and occasionally as high as 600 ng Sn l⁻¹ (Batley, 1996). However, we should not conclude that TBT pollution poses no risk to the larvae of *N. reticulatus* under natural conditions because if one would extend the time of exposure of the tests lower effective concentrations would certainly be found, although it is uncertain if they would approach the concentrations that occur in the environment. For instance, the LC₅₀ in *Mytilus edulis* larvae varies drastically from 943 ng TBT-Sn L⁻¹ for 24 h to 41 ng TBT-Sn L⁻¹ for 15 days (Thain, 1983; Beaumont & Budd, 1984). Moreover, beyond lethal effects, TBT exposure may also reduce the condition or cause malformations to the larvae that will affect the settlement and the recruitment of new individuals to the population. Horiguchi *et al.* (1998) noticed some effects on the larvae swimming behaviour, irregular

movement of the cilia due to atrophy of velum and stripping out the larvae from the shell when exposed to lower TBT concentrations. These effects were, in part, observed in the present work, although we could still not find a reliable method to quantify and test them. Hence, future research should attend for lethal and sub-lethal effects of TBT on *N. reticulatus* larvae for longer periods of exposure.

References

- Alzieu C (2000) Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. Ecotoxicology 9 (1-2): 71-76
- ASTM (1998) Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. Section E72494, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- Barreiro R, González R, Quintela M & Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. Marine Ecology Progress Series 218: 203-212
- Barroso CM, Moreira MH & Bebiano MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese Coast. Marine Ecology Progress Series 230: 127-135
- Barroso C M & Moreira MH (1998) Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. Journal of Marine Biological Association of United Kingdom 78: 1233-1246
- Barroso CM & Moreira MH (2002) Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese Coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. Marine Pollution Bulletin 44: 480-48
- Barroso CM, Moreira MH & Gibbs PE (2000) Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a Southern Europe estuarine System (Ria de Aveiro, NW Portugal). Marine Ecology Progress Series 218: 221-232
- Batley G (1996) The distribution and fate of Tributyltin in the marine environment. In de Mora SJ (Ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge environmental chemistry series No. 8. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 139-166

Beaumont AR & Budd MD (1984) High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Marine Pollution Bulletin* 15: 402-405

Beiras R, Fernandez N, Bellas J, Besada V, Gonzalez-Quijano A & Nunes T (2003) Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52: 1209-1224

Bryan GW & Gibbs PE (1991) Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In Newman MC and McIntosh AW (Eds) *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications*. Lewis Publishers Inc., Ann Arbor, FL, pp. 323-361

Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE & Pascoe PL (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* 73: 913-929

Fernandez N & Beiras R (2001) Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10: 263-271

Finney DJ (1971) *Probit Analysis*. Cambridge University Press

Fretter V & Graham A (1994) British prosobranch molluscs, their functional anatomy and ecology Dorchester: Dorset Press, pp. 522-524

Graham A (1988) Molluscs: prosobranch and pyramidellid gastropods. *Synopses of the british fauna (new series)* 2. Brill Academic Publishers, Leiden

Geffard O, His E, Budzinski H, Seaman M & Garrigues P (2001) Qualite biologique de l'eau de mer evallee in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*: In situ monitoring of sea water quality with the embryo-larval bioassay of *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324: 1149-1155

Gibbs PE & Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In de Mora SJ (Ed.) *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* Cambridge: Cambridge University Press, pp. 21-61

His E, Seaman MNL & Beiras R (1997) A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research* 31: 351-355

His E, Heyvang I, Geffard O & de Montaudouin X (1999) A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research* 33: 1706-1718

Horiguchi T, Imai T, Cho HS, Shiraishi H, Shibata Y, Morita M & Shimizu M (1998) Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus*, and the giant abalone *Haliotus medaka*. Marine Environmental Research 46: 469-473

Labare ML, Coon SL, Matthias C & Weiner RM (1997) Magnification of tributyltin toxicity to oyster larvae by bioconcentration in biofilms of *Shewanella colwelliana*. Applied and Environmental Microbiology 63: 4107-4110

Lapota D, Rosenberger DE, Platter-Rieger MF & Seligman PF (1993) Growth and survival of *Mytilus edulis* larvae exposed to low levels of dibutyltin and tributyltin. Marine Biology 115: 413-419

Matthiessen P & Gibbs PE (1998) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Environmental Toxicology and Chemistry 17: 37-43

Reichelt-Brushett AJ & Harrison PL (2000) The effect of copper on the settlement success of larvae from the scleractinian coral *Acropora tenuis*. Marine Pollution Bulletin 41: 385-391

Robert R & His E (1981) Action de l'acetate de tributyle etain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d'interet commercial : *Crassaostrea gigas* (Thunberg) et *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). ICES CM 1981/F 42, 16 p in Ruiz JM, Bryan GW, Gibbs PE & Wigham GD (1995c) Effects of tributyltin (TBT) exposure on the reproduction and embryonic development of the bivalve *Scrobicularia plana*. Marine Environmental Research 40: 363-379

Roberts MH (1987) Acute toxicity of tributyltin chloride to embryos and larvae of two bivalve molluscs, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 39: 1012-1019

Ruiz JM, Bryan GW & Gibbs PE (1995a) Effects of tributyltin (TBT) exposure on the veliger larvae development of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 186: 53-63

Ruiz JM, Bryan GW & Gibbs PE (1995b) Acute and chronic toxicity of tributyltin (TBT) to pediveliger larvae of the bivalve *Scrobicularia plana*. Marine Biology 124: 119-126

Ruiz JM, Bryan GW, Gibbs PE & Wigham GD (1995c) Effects of tributyltin (TBT) exposure on the reproduction and embryonic development of the bivalve *Scrobicularia plana*. Marine Environmental Research 40: 363-379

- Ruiz JM, Quintela M & Barreiro R (1998) Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): a possible effect of nearshore shipping. *Marine Ecology Progress Series* 164: 237-244
- Smith BS (1971) Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 377-378
- 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
- Tallmark B (1980) Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda: Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Marine Ecology Progress Series* 3: 51-62
- Thain JE (1983) The acute toxicity os bis (tributyltin) oxide to the adults and larvae of some marine organisms. ICES Paper Cm 1983/E:13 (mimeograph). International Council for the Exploration of the sea, Copenhagen
- Zar JH (1996) Biostatistical Analysis, 3rd edition. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, NJ

CAPÍTULO 5

Discussão

5.1. Discussão

Na sequência das campanhas de monitorização descritas nos capítulos 2 e 3 da presente dissertação é possível concluir que a Costa Portuguesa se encontra afectada pela poluição provocada por tributilestanho (TBT), tanto ao longo da linha de costa como na plataforma continental. A poluição é elevada junto a sistemas estuarinos onde os portos estão localizados e reduzida em zonas distantes da influência dos mesmos, sendo evidente a existência de gradientes crescentes de poluição do mar em direcção aos portos. Nos portos registaram-se valores médios de concentrações de TBT nos tecidos das fêmeas de *Nassarius reticulatus* na ordem das 600 ng Sn g⁻¹ e elevados valores de imórexo (%I = 100%, VDSI ≈ 4.5 e RPLI ≈ 69%). Foram ainda detectadas fêmeas estéreis no interior dos portos de Viana do Castelo e Aveiro. Embora o número de fêmeas estéreis encontradas no presente trabalho seja reduzido, os elevados índices de imórexo registados podem, eventualmente, ter impactos negativos ao nível das populações de *N. reticulatus*. No futuro será importante investigar se o elevado grau de desenvolvimento do vaso deferente e o estádio avançado de convolução do oviducto podem ter implicações no sucesso reprodutivo das populações.

Os valores elevados registados nos portos contrastam com os valores obtidos para locais longe da influência dos mesmos, quer se considere as praias expostas, quer se considere os locais amostrados ao longo da plataforma continental entre Leixões e Aveiro [Capítulo 3]. Para a plataforma continental os valores mais elevados de imórexo foram observados em zonas sob influência dos portos (ao largo de Aveiro e a Sul de Leixões) ou de outras fontes potenciais de contaminação, tais como os ancoradouros e os exutores submarinos. Apesar

de se ter verificado a existência de poluição difusa na área da plataforma continental até aos 33 m de profundidade, os níveis de poluição descritos são muito inferiores aos registados para a linha de costa e, particularmente, para os sistemas estuarinos, acentuando a ideia de que quanto maior for a distância aos portos menor será o nível de poluição.

Os sistemas estuarinos são assim identificados como as principais fontes de contaminação na Costa Portuguesa. Tal, deve-se ao facto destes locais estarem sujeitos a uma elevada actividade naval que deriva não só dos navios se encontrarem atracados, mas também das operações de manutenção em doca seca, como reparação de cascos e remoção e/ou aplicação de uma nova camada de tinta. Nestes locais a quantidade de TBT libertado para a água é muito elevada reflectindo-se nas concentrações de TBT nos tecidos das fêmeas. Os valores de imenso registo nestes locais são semelhantes aos descritos para os portos mais poluídos de Espanha (Barreiro *et al.*, 2001), França (Stroben *et al.*, 1992) e Inglaterra (Bryan *et al.*, 1993).

Do presente trabalho é possível deduzir que os níveis de poluição por TBT na Costa Portuguesa têm impactos negativos em diversas espécies. Valores de VDSI = 1 em *N. reticulatus* são indicativos de concentrações de TBT na água por volta de 0.8 – 2.0 ng Sn L⁻¹ (Huet *et al.*, 1995). Este valor é superior ao valor standard proposto pelas agências internacionais: 0.4 ng Sn L⁻¹ para a Agência Ambiental Norte Americana (US EPA, 2002) e 0.8 ng Sn L⁻¹ para a Agência Ambiental do Reino Unido (Coelho *et al.*, 2002). Sabe-se que concentrações de TBT na água de 0.5 ng Sn L⁻¹ afectam a produção do plâncton, concentrações de 0.7 ng Sn L⁻¹ provocam anomalias na calcificação das conchas de *Crassostrea gigas* (Alzieu & Michel, 1998), e concentrações superiores a 8 ng Sn L⁻¹ induzem alterações reprodutivas nos moluscos bivalves (Alzieu & Michel, 1998). Por outro lado, existem espécies de gastrópodes mais sensíveis ao TBT do que *N. reticulatus*, como por exemplo *Ocinebrina aciculata*, *Nucella lapillus* e *Ocinebra erinacea* (Huet *et al.*, 1995; Gibbs & Bryan, 1996; Oehlmann *et al.*, 1996; Barroso *et al.*, 2002), sendo provável que as populações destes gastrópodes possam apresentar níveis de imenso mais elevados e encontrarem-se estéreis ou perto

da esterilização. Por exemplo, em locais em que o nível de impossexismo em *N. reticulatus* é elevado (VDSI > 1), *Nucella lapillus* encontra-se muito afectada (VDSI > 4) e em casos extremos pode estar extinta, como consequência do elevado grau de poluição por TBT (Barroso *et al.*, 2000). Tal é facilmente explicável porque concentrações de 1.6 ng Sn L⁻¹ provocam esterilidade nas fêmeas de *N. lapillus* (Bryan & Gibbs, 1991).

O nível actual de poluição por TBT na Costa Portuguesa pode ainda ter efeitos nos recursos pesqueiros portugueses, como acontece actualmente com a produção de ostra na Ria de Aveiro (Barroso, 2004).

Estes factos confirmam que a poluição por TBT se encontra ainda mais generalizada do que anteriormente se julgava e tem impactos negativos generalizados ao nível de todo o ecossistema marinho da Costa Continental Portuguesa.

O estudo da evolução temporal da poluição ao longo da costa sugere que não houve variação global dos níveis de impossexismo entre 2000 e 2003, corroborando a ideia de que não ocorreu um declínio da utilização de tintas com TBT. Mais ainda, os resultados obtidos relativamente às concentrações relativas de TBT e dos seus subprodutos nos tecidos de *N. reticulatus* sugerem uma introdução recente deste poluente no ambiente. Desta forma, e em concordância com estudos anteriores (Barroso & Moreira, 2002; Santos *et al.*, 2002), a ineficácia da directiva europeia 89/677 para o território nacional é novamente comprovada.

Os valores obtidos no âmbito da presente dissertação constituem uma base de referência fundamental para futuros trabalhos de biomonitorização, dado que dizem respeito ao ano em que a Convenção da IMO entrou em vigor. Por outro lado, os valores obtidos no capítulo 3 da presente dissertação constituem os primeiros valores de referência relativos à poluição em zonas da plataforma continental, confirmando os resultados obtidos para o Mar do Norte em que se verificou a existência de impossexismo em zonas de mar aberto (ten Halls-Tjabbes *et al.*, 1994, 2003).

Do estudo da toxicidade do TBT na fase larvar de *N. reticulatus* resultaram valores de concentrações efectivas superiores às descritas para outras larvas de gastrópodes (Horiguchi et al., 1998) com valores de LC₅₀ entre 4870 ng TBT-Sn L⁻¹ e 1780 ng TBT-Sn L⁻¹ para as 24 e 96 h, respectivamente. Concentrações desta magnitude não ocorrem, geralmente, no ambiente marinho. No entanto, estes resultados reportam somente a efeitos letais em ensaios agudos pelo que não podem ser extrapolados para a situação real que ocorre na natureza. De facto, concentrações inferiores podem induzir anomalias no desenvolvimento larvar que diminuem a eficiência em vários processos biológicos, podendo afectar o recrutamento, tal como descrito por Horiguchi et al. (1998) para outras espécies. Sugere-se, no futuro, o estudo dos efeitos subletais para tempos de exposição mais longos nas larvas deste gastrópode por forma a melhor avaliar a extensão dos efeitos do TBT no recrutamento das populações.

5.1. Considerações finais

Com o trabalho desenvolvido no âmbito da presente dissertação foi possível estabelecer e caracterizar os gradientes espaciais e temporais da poluição por TBT na Costa Portuguesa. Foi possível identificar os portos como as principais fontes de poluição, verificar que a poluição se encontra generalizada quer ao longo da costa quer ao largo, e que existe uma tendência de manutenção dos níveis de imenso ao longo dos últimos anos.

Nassarius reticulatus revelou-se um bom bioindicador da poluição por TBT uma vez que: (i) é abundante ao longo de toda a costa, incluindo áreas estuarinas (que correspondem a locais críticos de contaminação) e zonas de mar aberto (para as quais a dificuldade na amostragem de organismos indicadores tem sido reportada); (ii) apresenta correlações muito significativas entre a concentração de TBT nos tecidos das fêmeas e os índices de imenso registados; (iii) porque é moderadamente sensível ao TBT permitindo a descrição dos gradientes de poluição em torno das fontes de poluição.

Referências

- Alzieu C & Michel P (1998) L'étain et les organoétains en milieu marin: biogéochimie et ecotoxicologie. Repères Océan, Edit Ifremer 15: 104 p
- Barreiro R, González R, Quintela M & Ruiz JM (2001) Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. Marine Ecology Progress Series 218: 203-212
- Barroso CM, Mendo S & Moreira MH (2004) Organotin contamination in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Portuguese Coastal waters. Marine Pollution Bulletin 48 (11-12) : 1149-1153
- Barroso CM & Moreira MH (2002) 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 & Bebiano MJ (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese Coast. Marine Ecology Progress Series 230: 127-135
- Barroso CM, Moreira MH & Gibbs PE (2000) Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a Southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). Marine Ecology Progress Series 201: 221-232
- Bryan GW & Gibbs PE (1991) Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In Newman MC and McIntosh AW (Eds) Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications. Lewis Publishers Inc., Ann Arbor, FL, pp. 323-361
- Bryan GW, Burt GR, Gibbs PE & Pascoe PL (1993) *Nassarius reticulatus* (Nassariidae : Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom 73: 913-929
- Coelho MR, Bebiano MJ & Langston WJ (2002) Organotin levels in the Ria Formosa lagoon, Portugal. Applied Organometallic Chemistry 16: 384-390
- Gibbs PE & Bryan GW (1996) TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In de Mora SJ (Ed.) Tributyltin: case study of an environmental contaminant Cambridge: Cambridge University Press, pp. 21-61

ten Hallers-Tjabbes CC , Kemp JF & Boon JP (1994) Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North-Sea: relation to shipping traffic intensities. Marine Pollution Bulletin 28: 311-313

ten Hallers-Tjabbes CC, Wegener J-W, van Hattum B, Kemp JF, ten Hallers E, Reitsema TJ & Boon JP (2003) Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. Marine Environmental Research 55: 203-233

Horiguchi T, Imai T, Cho HS, Shiraishi H, Shibata Y, Morita M & Shimizu M (1998) Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus*, and the giant abalone *Haliotus medaka*. Marine Environmental Research 46: 469-473

Huet M, Fioroni P, Oehlmann J & Stroben E (1995) Comparison of imposex response in three prosobranch species. Hydrobiologia 309: 29-35

Oehlmann J, Stroben E & Fioroni P (1993) Fréquence et degré d'expression du pseudohermaphrodisme chez quelques prosobranches sténoglosses des côtes françaises (surtout de la baie de Morlaix et de la Manche) 2. Situation jusqu'au printemps de 1992. Cahiers de Biologie Marine 34: 343-362

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

Stroben E, Oehlmann J & Fioroni P (1992) *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropods tributyltin bioindicators. Marine Biology 114: 289-296

U.S. EPA (2002) Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT). EPA-822-B-02-001, Washington, DC