



**Diana Medeiros
Gomes**

**Monitorização dos níveis de *imposex* em *Nucella lapillus*
(Ria de Aveiro, Portugal) e *Gemophos viverratus* (São
Vicente, Cabo Verde)**

**Monitoring *imposex* levels in *Nucella lapillus* from Ria de
Aveiro (Portugal) and *Gemophos viverratus* from São
Vicente (Cabo Verde)**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Diana Medeiros
Gomes**

Monitorização dos níveis de *imposex* em *Nucella lapillus* (Ria de Aveiro, Portugal) e *Gemophos viverratus* (São Vicente, Cabo Verde)

Monitoring *imposex* levels in *Nucella lapillus* from Ria de Aveiro (Portugal) and *Gemophos viverratus* from São Vicente (Cabo Verde)

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso, Professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação da Professora Doutora Corrine Almeida, Professora do Departamento de Engenharias e Ciências do Mar da Universidade de Cabo Verde.

o júri

Presidente

Professor Doutor Ulisses de Miranda Azeiteiro
Professor Associado com Agregação, Universidade de Aveiro

Vogal - Arguente principal

Doutora Ana Catarina Almeida Sousa
Investigadora, Ciceco – Universidade de Aveiro

Vogal - Orientador

Professor Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso
Professor Auxiliar, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Todo as minhas conquistas foram concretizadas com o apoio de várias pessoas. Gostaria de agradecer:

Primeiro que tudo, aos meus pais, Faustino e Deolinda, e à minha irmã, Liliana, por todo o apoio incondicional nas etapas que já percorri. Por nunca me terem cortado as asas por mais difícil e exigente que fosse o caminho a nível emocional e financeiro. Palavras nunca vão chegar...

Ao meu orientador, ao Professor Carlos Miguez Barroso, por me guiar e incentivar a fazer sempre melhor. Por todo o conhecimento, apoio e tempo que foram importantes para a concretização desta etapa. E por me consentir ir à descoberta para Cabo Verde neste estágio, algo que nunca vou esquecer.

Professora Corrine Almeida por ter prontamente aceite receber-me no seu departamento, e me receber tão bem.

Ao Luís e à Anica da DiveTribe, por me terem aceite para a realização deste estágio, mesmo que as coisas não tenham sempre corrido como o esperado. Foi uma experiência enriquecedora a todos os níveis e que nunca esquecerei. Um agradecimento muito especial à Anica, pela companhia, tanto nos momentos bons como nos menos bons (que já não interessam), as idas à conservatória, caipiroscas ao pôr-do-sol e o resto tu sabes...

Ao staff da DiveTribe, Sidney, Bomba e Éder. Não consigo escrever este agradecimento sem me emocionar, porque foram vocês que tornaram esta experiência tão inesquecível para mim. Só posso dizer um grande obrigada e, espero que, um até já. Ao resto da minha família Cabo-Verdiana, Alice, Koiv, Alnice, Griselda, Rivaldo, Jani, Djay, Chida, Kelvin, Zovsky, Samu, Rasta, Mandi, Corrine por alegrarem todos os meus dias, não vou esquecer... Vida na Soncent ê sab mod m'tive bzot d nha lod. Mi ê dod na bzot.

Por último, mas nunca menos importante, os meus amigos de sempre Marta, André, Daniela M, Daniela V, Inês, Debora, Andreia Miguel, Sara, Luís e Batata

palavras-chave

Organoestânicos; Tributilestanho; TBT; *imposex*; biondicador; biomarcador; *Nucella lapillus*; *Gemophos viverratus*, Ria de Aveiro, Ilha de São Vicente.

resumo

O uso de sistemas anti-vegetativos com base em compostos orgânicos de estanho (OT-AFS), como o tributilestanho (TBT), foi amplamente usado desde 1960s. A toxicidade deste composto originou uma série de efeitos adversos em vários organismos não alvo. Um dos efeitos mais conhecidos provocados pela poluição por TBT é o *imposex*, definido como a imposição de caracteres sexuais masculinos (como pénis e vaso deferente) em fêmeas de gastrópodes. Este rapidamente se tornou num biomarcador para monitorizar a poluição por TBT, sendo amplamente usado em programas de monitorização a nível mundial.

O principal objetivo desta dissertação passa pela monitorização dos níveis de *imposex* em dois países, Portugal e Cabo Verde, que têm restrições legais distintas no que diz respeito ao uso de OT-AFS. Em Portugal, o uso destes AFS tem sido restringido de forma progressiva desde 1993. Foi ainda ratificada a “convenção internacional para o controlo de sistemas anti-vegetativos nocivos em navios” (Convenção AFS) da IMO que veio proibir o uso de OT-AFS desde setembro de 2008. Em contrapartida, Cabo Verde nunca desenvolveu legislação nacional de forma a restringir o uso de OT-AFS, assim como não ratificou a convenção AFS. Deste modo, o presente trabalho analisou a evolução temporal de *imposex* para as espécies *Gemophos viverratus* na Ilha de São Vicente (Cabo Verde) e *Nucella lapillus* na Ria de Aveiro (Portugal), tendo como objetivo proceder à comparação do impacto da poluição em cada área de estudo, dado o respetivo contexto legislativo.

Indivíduos de *Gemophos viverratus* foram amostrados em 6 locais na Ilha de São Vicente em 2019, com o intuito de avaliar a evolução da poluição por TBT nesta área entre 2012 (dados previamente descritos por outros autores) e 2019.

O índice da sequência do vaso deferente (VDSI), o índice do tamanho relativo do pénis (RPLI), a percentagem de fêmeas afetadas por *imposex* (%I) e a percentagem de fêmeas esterilizadas (%S) relativos a 2019 variaram desde 0-4,0, 0-84,4%, 0-100% e 0-5,1%, respetivamente. Os níveis de *imposex* foram mais elevados no interior da baía de Porto Grande, onde estão localizadas as principais fontes de poluição por TBT (portos, estaleiros e marinas). Os níveis de *imposex* nesta espécie permanecem elevados desde 2012, não se verificando uma melhoria ao longo dos últimos sete anos.

Indivíduos da espécie *Nucella lapillus* foram amostrados em 8 locais na Ria de Aveiro em 2018 e 2019, e os níveis de *imposex* foram comparados com pesquisas realizadas em 2013 e anos anteriores (dados disponíveis desde 1997). A evolução temporal observada denota um declínio global da intensidade de *imposex* na área de estudo desde 2003, como resultado da implementação da legislação. Não obstante, dados de 2018/2019 indicam que as populações de *N. lapillus* ainda permanecem afetadas por *imposex* com níveis aproximadamente similares a 2013: VDSI= 0,37-1,0; I%=37-100; %S=0,0. A presença de TBT na área podem ser putativamente atribuída à contaminação dos sedimentos.

As conclusões deste trabalho contribuem para perceber que, apesar da proibição global de OT-AFS ser proclamada como um sucesso ambiental, países que ratificaram a Convenção AFS, como Portugal, devem permanecer alerta atendendo aos níveis de *imposex* residuais ainda presentes nas populações de gastrópodes, e, países como a República de Cabo Verde, onde ainda existe falta de regulamentação de OT-AFS, devem tomar medidas urgentes para combater esta poluição, visto que a sua economia depende grandemente de um ecossistema marinho saudável.

keywords

Organotin; Tributyltin; TBT; *imposex*; bioindicator; biomarker; *Nucella lapillus*; *Gemophos viverratus*; Ria de Aveiro; São Vicente Island.

abstract

The use of antifouling systems (AFS) based on organotin compounds (OT-AFS), such as tributyltin (TBT), was widely used since the 1960s. The toxicity of this compound triggered a variety of adverse effects on several non-target organisms. One of the most deleterious impacts caused by TBT pollution is *imposex*, defined as the imposition of male sexual characters (such as penis and vas deferens) onto gastropod females. Soon it became a biomarker to monitor TBT pollution and has been used routinely in monitoring programs worldwide.

The main objective of this thesis is to monitor *imposex* levels in two countries, Portugal and Republic of Cabo Verde, which have distinct legal restrictions regarding the use of OT-AFS. In Portugal the use of these AFS has been progressively restricted since 1993, and this country ratified the IMO “International Convention on the Control of Harmful Antifouling System on Ships” (AFS Convention) that banned OT-AFS since September 2008. On the contrary, Cabo Verde never developed national legislation to restrict OT-AFS, nor did the government ratify the AFS Convention. The present work assessed the temporal evolution of *imposex* in *Gemophos viverratus* from São Vicente Island (Cabo Verde) and *Nucella lapillus* from Ria de Aveiro (Portugal), in order to compare the impact of this pollution in each study area, given the respective legislation context.

The whelk *Gemophos viverratus* was sampled at 6 sites in São Vicente Island in 2019, in order to evaluate the TBT pollution trend in this area between 2012 (data previously reported by other authors) and 2019. The Vas Deferens Sequence Index (VDSI), Relative Penis Length Index (RPLI), the percentage of females affected with imposex (%I) and the percentage of sterilized females (%S) regarding 2019 ranged

from 0-4.0, 0-84.4%, 0-100% and 0-5.1%, respectively. *Imposex* levels were highest at sites located inside the Porto Grande Bay, where the major TBT pollution sources are located (ports, dockyards and marinas). The *imposex* levels in this species remained high since 2012, with no improvement over the last seven years.

The dog-whelk *Nucella lapillus* was sampled at 8 sites in Ria de Aveiro during 2018 and 2019, and the levels of *imposex* were compared with surveys performed in 2013 and previous years (data available since 1997). The temporal trend observed denote a global decline in *imposex* intensity in the study area since 2003, as a consequence of the legislation. Nevertheless, data from 2018/2019 show that *N. lapillus* populations are still affected by *imposex* with levels roughly similar to 2013: VDSI= 0.37-1.0; I%=37-100; %S=0.0. New inputs of TBT in the area can be putatively attributed to "historical" TBT contamination of sediments.

The conclusions of this study contribute to perceive that although the global ban on OT-AFS has been heralded as an environmental success, countries that have ratified the AFS Convention, such as Portugal, should remain aware of the residual *imposex* levels still present in gastropod populations, and countries, such as the Republic of Cabo Verde, where there is still a lack of regulation of OT-AFS, should take immediate action, as their economy rely on healthy marine ecosystems.

“Hey, don’t worry; don’t be afraid, ever,
because this is just a ride.”

Bill Hick

Índice

Capítulo 1 – Introdução Geral.....	1
1.1. Tintas anti-vegetativas com TBT	3
1.2. <i>Imposex</i>	4
1.2.1. <i>Nucella lapillus</i>	6
1.2.2. <i>Gemophos viverratus</i>	9
1.3. Legislação	14
1.4. Objetivos e fundamentos da dissertação	16
1.5.1. Ria de Aveiro, Portugal.....	17
1.5.2. Cabo Verde.....	20
1.5.2.1. São Vicente, Cabo Verde.....	21
1.6. Referências bibliográficas.....	23
Capítulo 2 – Assessment of imposex in <i>Gemophos viverratus</i> from São Vicente (Republic of Cabo Verde): a resurvey in 2019	31
Abstract.....	33
2.1. Introduction	35
2.2. Methods.....	36
2.2.1. Study area	36
2.2.2. Sampling and imposex analysis	36
2.3. Results.....	38
2.3.1. Imposex levels in 2019.....	38
2.3.2. Imposex evolution between 2012 and 2019	38
2.4. Discussion	42
2.5. References	44

Capítulo 3 – Long-term monitoring of <i>Nucella lapillus</i> imposex in Ria de Aveiro (Portugal): when will a fully recovery happen?.....	47
Abstract.....	49
3.1. Introduction.....	51
3.2. Materials and methods.....	52
3.2.1. Sampling and imposex analysis.....	52
3.3. Results.....	53
3.4. Discussion.....	56
3.5. Literature cited.....	57
Capítulo 4 – Considerações finais.....	59
4.2. Tendências temporais da poluição por TBT na Ria de Aveiro.....	62
4.3. Tendências temporais da poluição por TBT em Cabo Verde.....	63
4.3.1. Importância do turismo na República de Cabo Verde.....	63
4.3.2. Importância da pesca na República de Cabo Verde.....	64
4.4. Sugestões para investigações futuras.....	67
4.4. Referência bibliográficas.....	67

Lista de Figuras/ List of figures

Figura 1.1 – <i>Nucella lapillus</i> . Exemplar recolhido na Costa Nova, Portugal	6
Figura 1.2 – Variação de cores de <i>Nucella lapillus</i> (Costa Nova, Portugal)	6
Figura 1.3 – <i>Nucella lapillus</i> . Espécimes e cápsulas de ovos encontrados na Torreira, Portugal	7
Figura 1.4 – <i>Nucella lapillus</i> . Características externas de macho (A) e fêmea (B) após remoção da concha. Abreviações: a, ânus; bc, bursa copulatrix; em, extremidade do manto; f, fígado; ga, glândula albúmen; gc, glândula capsular; gh, glândula hipobrânquial; ge, glândula ingestora de esperma; gr, glândula retal; mc, músculo columela; o, opérculo; ov, ovário; pe, pé; p, pénis; pr, próstata; r, reto; td, tentáculo direito; t, testículos; vd, vaso deferente; v, vulva	8
Figura 1.5 – <i>Nucella lapillus</i> . Esquema de desenvolvimento do imposex dividido em 6 estádios. Abreviações: a, ânus; ca, massa de cápsulas abortadas, gc, glândula capsular; p, pénis; vd, vaso deferente; v, vulva	9
Figura 1.6 – <i>Gemophos viverratus</i> . Exemplar recolhido na Praia da Galé, Ilha de São Vicente, Cabo Verde	9
Figura 1.7 – <i>Gemophos viverratus</i> . A- Fêmea com cavidade do manto exposta. B- Macho com a cavidade do manto exposta. C- Fêmea com <i>imposex</i> . Abreviações: a, anus; em, extremidade do manto; o, olho; pe, pé; p, pénis; pd, próstata distal; pp, próstata proximal; t, tentáculo; va, vagina; vd, vaso deferente; v, vulva	10
Figura 1.8 – <i>Gemophos viverratus</i> . Estádios com tracejado não foram encontrados no estudo de Lopes-dos-Santos et al. (2014). Abreviações: bp, bainha do pénis; ca, cápsulas abortadas; dp, ducto peniano; gc, glândula capsular; gca, glândula capsular aberta; ocv, oclusão da vulva; p, pénis; pr, próstata; ps, bainha do pénis; t, tentáculo; vd, vaso deferente	13
Figura 1.9 – Mapa da Ria de Aveiro, Portugal	19

Figura 1.10 – Mapa da República de Cabo Verde	21
Figura 1.11 – Mapa topográfico da ilha de São Vicente, Cabo Verde	22
Figure 2.1 – Map of São Vicente island indicating the main harbor activities and sampling sites (Stns. 1 to 6)	37
Figure 2.2 – Ship traffic activity in Porto Grande harbor between 2012 and 2018 expressed in terms of the total number of ships entered and also the number of cabotage ships (included in the total number of ships). Data obtained from ENAPOR, Portos de Cabo Verde website (online available @ http://www.enapor.cv/page/homepage)	39
Figure 2.3 – <i>Gemophos viverratus</i> . Imposex development scheme adapted from Lopes-dos-Santos et al. (2014). Dashed drawings refer to stages that were not observed by the above-mentioned authors and also the present work. Abbreviations: ac, aborted capsules; cg, capsule gland; obc, open bursa copulatrix; ocg, open capsule gland; ocv, occlusion of the vulva; p, penis; pd, penis duct; pr, prostate; ps, penis sheath; te, tentacle; vd, vas deferens; vu, vulva.....	41
Figure 3.1 – Ria de Aveiro and adjacent coastal area map indicating sampling stations location	53
Figure 3.2 – Commercial ship traffic activity between 2012 and 2018 expressed in terms of total numbers of ships entered (No.) and total gross tonnage (GT). Data obtained from Porto de Aveiro website (online available @ http://ww2.portodeaveiro.pt/)	54
Figure 3.3 – VDSI levels in <i>Nucella lapillus</i> over the years for station 1 (Marégrafo), station 2 (Forte da Barra), station 4 (Costa Nova) and station 5 (Vagueira). Data on imposex levels between 1997 and 2007 were taken from Barroso et al. (2000) and Galante-Oliveira et al. (2009). Data from 2013 were taken from Laranjeiro et al. (2015)	54

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Levels of imposex found in the study area in 2012 (Lopes-dos-Santos et al., 2014) and the current study (2019). Number of males (N_M) and females (N_F) with respective mean shell height (SH); mean female penis length (FPL); percentage of imposex-affected females (%I); relative penis length index (RPLI) and vas deferens sequence index (VDSI). Mean values are displayed with the respective standard deviation as “mean \pm s.d.” for FPL and VDSI40

Tabela 3.1 - *Nucella lapillus* imposex long-term monitoring. Number of analyzed specimens, male and female shell heights (mm), per site and year. Indication of percentage of imposex affected females (%I), relative penis size index (RPSI) and vas deferens sequence index (VDSI). Statistical comparisons of results between 2013 (data taken from Laranjeiro et al., 2015), 2018 and 2019 are given next to VDSI values: one-way ANOVA: “a” designates a significant difference ($p < 0.05$) comparing to 2013; “b” designates a significant difference ($p < 0.05$) comparing to 2018. For additional data on sites locations see Fig. 3.1. Due to the lack of space, some years are represented by two digits55

List of abbreviations/Lista de abreviaturas

AFS – Antifouling system/Sistemas anti vegetativos

DBT – Dibutyltin /Dibutilestanho

DDT – Dichlorodiphenyltrichloroethane/Diclorodifeniltricloroetano

EC – European Comission/Comissão Europeia

EcoQO – Ecological Quality Objective/Objetivo de Qualidade Ecológica

FPL – Female Penis Length/Comprimento pénis das fêmeas

GT – Gross Tonnage/Arqueação bruta

IMO – International Maritime Organization/Organização Marítima Internacional

JAMP – Joint Assessment & Monitoring Programme/Programa Conjunto de Avaliação e Monitorização

MBT – Monobutyltin/Monobutilestanho

MEPC – Marine Environment Protection Committee/Comité Proteção Ambiente Marinho

OSPAR – Convention for The Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic/Convenção para a Proteção do Meio Marinho do Atlântico Nordeste

OT – Organotin/Organoestanho

PPAR γ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor/Recetores Ativados por Proliferador de Peroxissoma

RPLI – Relative Penis Length Index/Índice do tamanho do pénis relativo

RPSI – Relative Penis Size Index/Índice do tamanho do pénis relativo

RXR – Retinoid X receptor/Recetor retinoide X

TBT – Tributyltin /Tributilestanho

VDSI – Vas Deferens Sequence Index/ Índice Sequência de Vaso Deferente

Capítulo 1 – Introdução Geral

1.1. Tintas anti-vegetativas com TBT

Ao longo das últimas décadas, vários métodos têm sido utilizados de modo a prevenir a bio-incrustação, isto é, precaver a fixação de organismos (bactérias, diatomáceas, moluscos, esponjas, algas, etc.) em superfícies submersas (ex.: sonares, plataformas marinhas, cascos de embarcações, bóias, etc.) que são prejudiciais ao seu funcionamento e eficácia¹. No caso das embarcações, a bio-incrustação é indesejável na medida em que eleva o consumo de combustível, aumenta a frequência das operações em doca seca e provoca impactos negativos nos equilíbrios dos ecossistemas marinhos devido à introdução de espécies exóticas^{2,3,4}. Como consequência, os sistemas anti-vegetativos (AFS – acrónimo derivado do termo em inglês *antifouling systems*) eram amplamente aplicados em cascos de navios de forma a precaver a bio-incrustação^{5,6}.

As primeiras tintas anti-vegetativas eram constituídas, maioritariamente, por agentes biocidas tóxicos como o diclorofeniltricloroetano (DDT), sais de cobre, organomercuriais e arsénico⁷. Mais tarde, nos anos 1950s, foram reconhecidas, pela primeira vez, as propriedades anti-vegetativas do tributilestano (TBT) pertencente ao conjunto de compostos de organoestânicos (OT).

O TBT, desde a descoberta das suas capacidades biocidas, começou a ser utilizado como um ingrediente ativo em tintas anti-vegetativas. Este biocida foi considerado eficaz, económico e um dos mais tóxicos para bactérias gram-positivas e fungos, com capacidade de impedir a fixação de um largo espectro de organismos aquáticos⁸. Apresentava as vantagens de ter uma elevada eficácia biocida nos cascos das embarcações, permitindo um período operacional que podia atingir os 5 anos, para além de se degradar em compostos menos tóxicos [como o dibutil estanho (DBT), monobutil estanho (MBT) e estanho inorgânico (Sn)], sendo considerado menos perigoso que outros biocidas usados até à altura, como o DDT e arsénico. Por estas razões, na década de 1990, o TBT tornou-se o biocida mais utilizado em AFS pela indústria naval, chegando a ser utilizado por cerca de 70% da frota mundial^{9,10,11}.

Do ponto de vista ecológico, o uso de AFS eficazes, como os baseados em TBT, oferecem benefícios ambientais. Estima-se que a aplicação dessas tintas esteja associada à

poupança de combustível, contribuindo para uma diminuição das emissões de dióxido de carbono na atmosfera. Por outro lado, previne a introdução de espécies exóticas nos ecossistemas^{12,13}.

Apesar dos benefícios, o TBT revelou-se um dos poluentes mais perigosos a ser introduzido de forma deliberada nos ecossistemas aquáticos, dada a sua toxicidade para uma grande diversidade de espécies não-alvo. O TBT foi concebido com uma toxicidade elevada de forma a ser eficaz nas superfícies dos navios. Contudo, uma vez introduzido no ambiente aquático, é dispersado e rapidamente adsorvido pela biota e partículas suspensas que se depositam mais tarde nos sedimentos¹⁴. Tem capacidade de se bioacumular nos organismos aquáticos, através do contacto com água, sedimentos, ou da ingestão de alimento contaminado¹⁵.

A sua elevada toxicidade foi observada inicialmente devido às má-formações nas conchas de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*), na baía de Arcachon, França¹⁶. O TBT causou anomalias na sua reprodução e deformações na concha devidas à calcificação da mesma, o que originou um declínio no mercado, traduzindo-se numa perda de milhões de dólares¹⁷. Até ao momento, já são vários os efeitos ecotoxicológicos da poluição por TBT descritos, que afetam diferentes grupos taxonómicos (fitoplâncton, crustáceos, moluscos, peixes e mamíferos)¹⁸. Mais recentemente, têm sido estudados, de forma mais afincada, os efeitos deste composto em humanos, devido ao seu efeito obesogénico. Do leque de grupos taxonómicos afetados, o que se verificou mais sensível a este composto é o táxon dos moluscos, devido à sua baixa capacidade para metabolizar e eliminar este composto que, como consequência, resulta numa maior bioacumulação do TBT, manifestando impactos negativos a concentrações inferiores que outros taxa¹⁸.

1.2. *Imposex*

O *imposex* é o principal efeito biológico em resposta à poluição por TBT em neogastrópodes. A masculinização em fêmeas de neogastrópodes foi inicialmente verificada por Blaber (1970)¹⁹ em fêmeas de *Nucella lapillus*, surgindo, em 1971, Smith²⁰ com o termo *imposex*, definido como a superimposição de órgãos genitais masculinos (vaso deferente e

pénis) em fêmeas de gastrópodes²⁰. Este fenómeno morfológico tornou-se um problema ecológico alarmante pois, nos seus estados mais avançados, desencadeia a esterilização das fêmeas que, conseqüentemente, provoca uma diminuição da população, ou mesmo a sua extinção²¹. Atualmente, o *imposex* tornou-se um dos efeitos mais bem estudados causados pelo TBT e, por essa razão, considerado como um dos biomarcadores mais precisos e fidedignos na biomonitorização da poluição por TBT²². Tem uma elevada especificidade e sensibilidade, é classificado através de uma simples observação com suporte a esquemas de classificação definidos para as diferentes espécies, não requer um elevado consumo de tempo e é um método de baixo custo, visto não ser necessário o uso de equipamento sofisticado²³. Permite, também, inferir sobre a quantidade de TBT presente, devido à elevada correlação entre o *imposex* e os níveis de TBT encontrados nos tecidos dos animais²⁴. É importante mencionar que o *imposex* é um fenómeno irreversível, o que significa que o nível observado num determinado indivíduo corresponde ao total de TBT acumulado ao longo de toda a sua vida²⁵.

O *imposex* é geralmente calculado através de diferentes índices: o tamanho relativo do pénis (RPSI), calculado pela equação $[(\text{média do tamanho do pénis das fêmeas})^3 / (\text{média do tamanho do pénis dos machos})^3 \times 100]$ ²¹ ou comprimento relativo do pénis (RPLI) calculado pela equação $(\text{média do comprimento do pénis nas fêmeas} / \text{média do comprimento do pénis nos machos} \times 100)$ ²¹, percentagem de fêmeas afetadas por *imposex* (%I), e percentagem de fêmeas estéreis (%S), índice de sequência de vaso deferente (VDSI). O parâmetro mais importante a determinar no estudo do *imposex* é o índice da sequência de vaso deferente (VDSI) porque (i) permite comparação de espécies de gastrópodes afetados relativamente à sensibilidade à poluição por TBT, (ii) não existem variações sazonais associadas, (iii) é o único índice que apresenta significância ecológica, pois permite identificar a proporção de fêmeas esterilizadas na população e, como tal, determinar a capacidade reprodutiva da população, (iv) exhibe maior sensibilidade para a intensidade de *imposex* do que outros índices (RPLI, RPSI) e (v) é o índice que exhibe uma maior correlação com os níveis de TBT²⁶. Atualmente, o *imposex* já foi descrito para cerca de 260 espécies de gastrópodes, muitas das quais utilizadas como bioindicador fiável em estudos de biomonitorização²⁶. Neste estudo, foram seleccionadas duas espécies bioindicador: *Nucella lapillus* (Portugal) e *Gemophos viverratus* (Cabo Verde).

1.2.1. *Nucella lapillus*

N. lapillus (Fig. 1.1) é um neogastropode maioritariamente encontrado em zonas rochosas costeiras, em locais com elevada exposição à ondulação e, também, zonas abrigadas. É uma espécie com ampla distribuição no Norte do oceano Atlântico: Sul de Portugal até ao norte da Rússia, Gronelândia, Islândia e zona norte dos Estados Unidos da América²⁷.



Figura 1.1 - *Nucella lapillus*. Exemplar recolhido na Costa Nova, Portugal.

A sua concha é cónica e firme, com tamanhos comumente entre 25-35 mm, no entanto, estes valores podem variar dependendo da exposição hidrodinâmica dos indivíduos no seu habitat: em locais abrigados a sua taxa de crescimento é superior e, como tal, a concha é mais alongada; em áreas com maior exposição à ondulação, a sua concha tem um tamanho inferior tornando-se mais pequena e robusta²⁷. Tem também uma variabilidade de cores: branca, amarela, castanha e cinzenta (Fig. 1.2). De acordo com Gibbs et al. (1999)²⁴, estas variações morfológicas encontradas entre diferentes populações podem ser atribuídas (i) à inexistente fase planctónica (capacidade de dispersão muito limitada), (ii) à reduzida capacidade de deslocação de adultos (os animais permanecem no mesmo local).

Na família Muricidae, neogastropodes como *N. lapillus* são carnívoros, alimentando-se maioritariamente de cracas e mexilhões, podendo incluir na sua dieta outros gastropodes ou bivalves²⁸.



Figura 1.2 - Variação de cores de *Nucella lapillus* (Costa Nova, Portugal).

A longevidade observada desta espécie são 6 anos (podendo ser ultrapassada em áreas abrigadas da elevada exposição ondular) e a maturidade sexual pode ser atingida após o segundo ano ou um pouco depois²⁴. Dependendo das regiões, a época de reprodução pode ser anual ou apenas em meses específicos²⁴. A reprodução inicia-se com o esperma a ser transferido para a bolsa copuladora durante a copulação, onde ocorre fertilização interna. Os ovos são fertilizados no oviduto e, posteriormente, agrupados em conjuntos de aproximadamente 600 ovos, que são encapsulados por secreções produzidas na glândula capsular. As cápsulas de ovos atravessam o oviduto e permanecem em contacto com a glândula pedal ventral. Por fim, atravessam um processo de moldação e endurecimento, de forma a serem posteriormente aplicadas numa superfície rochosa (locais abrigados ou até mesmo em concha de mexilhão) (Fig. 1.3)²⁴.

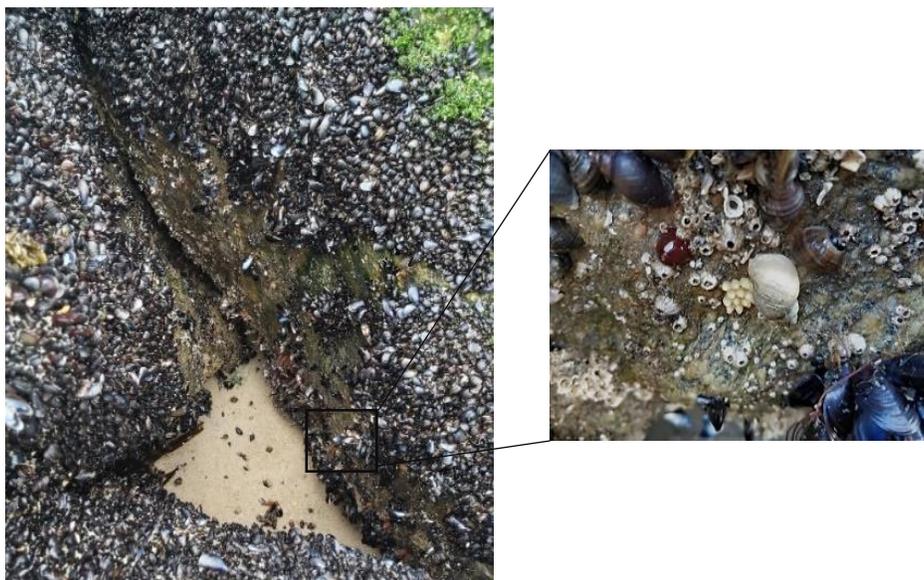


Figura 1.3 - *Nucella lapillus*. Espécimes e cápsulas de ovos encontrados na Torreira, Portugal.

A *N. lapillus* é uma espécie com sexos separados, no entanto, não é possível fazer a distinção entre macho (Fig. 1.4 A) e fêmea (Fig. 1.4 B) pelas características exteriores das suas conchas. Após a remoção do animal da concha, existem características que permitem distinguir ambos os sexos: (i) os machos têm um pénis posterior ao tentáculo direito e (ii)

presença da vesícula seminal nos machos; (iii) presença da glândula ingestora de esperma, nas fêmeas, com uma cor castanho-escura.

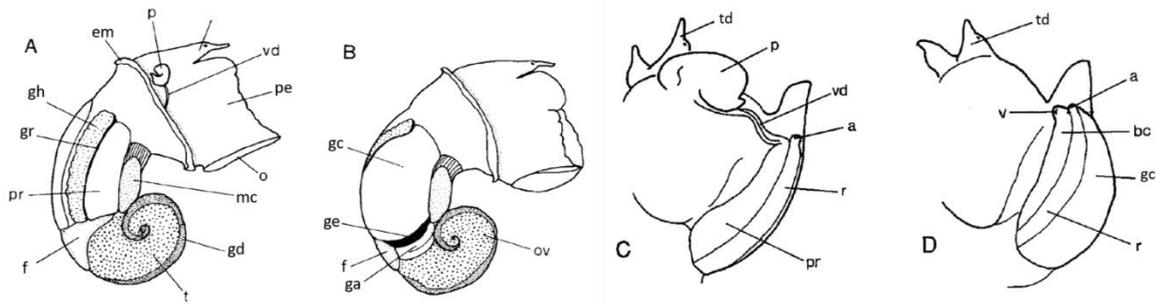


Figura 1.4 - *Nucella lapillus*. Características externas de macho (A,C) e fêmea (B,D) após remoção da concha. Abreviações: a, ânus; bc, bursa copulatrix; em, extremidade do manto; f, fígado; ga, glândula albúmen; gc, glândula capsular; gh, glândula hipobrânquial; ge, glândula ingestora de esperma; gr, glândula retal; mc, músculo columela; o, opérculo; ov, ovário; pe, pé; p, pênis; pr, próstata; r, reto; td, tentáculo direito; t, testículos; vd, vaso deferente; v, vulva. Adaptado de Gibbs et al. (1987)²⁰ e Gibbs et al. (1999)²⁴

As fêmeas com desenvolvimento de *imposex* têm como base a mesma estrutura de desenvolvimento dos machos, nestes o vaso deferente é o canal que se situa entre a próstata e o pênis. (Fig. 1.4 C). Nas fêmeas, o vaso deferente tem início na vulva, percorrendo o manto até ao pênis no seu estado mais avançado. Em 1987, Gibbs²¹ descreveu um esquema de sequência de vaso deferente (VDS) classificado de 0 a 6 de forma a classificar o desenvolvimento do nível de *imposex* em *N. lapillus* (Fig 1.5):

Estádio 1 – Formação de vaso deferente na vulva;

Estádio 2 – Desenvolvimento de pênis;

Estádio 3 – Crescimento de vaso deferente a partir do pênis e da vulva;

Estádio 4 – Canal do vaso deferente completo desde a vulva até ao pênis;

Estádio 5 – Desenvolvimento excessivo do vaso deferente com conseqüente oclusão da vulva;

Estádio 6 – Bloqueio das cápsulas de ovos originando a sua acumulação.

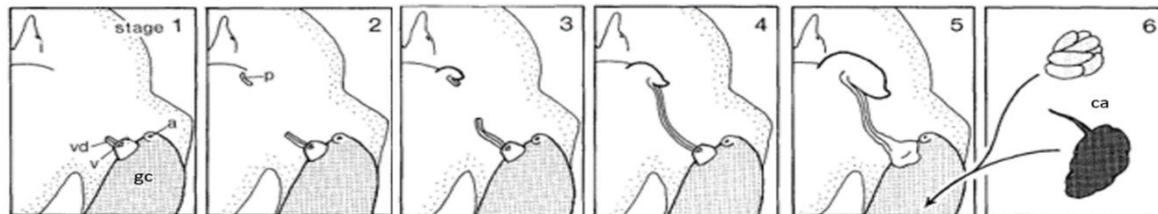


Figura 1.5 - *Nucella lapillus*. Esquema de desenvolvimento do imposex dividido em 6 estádios. Abreviações: a, ânus; ca, massa de cápsulas abortadas, gc, glândula capsular; p, pênis; vd, vaso deferente; v, vulva. Adptado de Gibbs et al 1987²⁰

1.2.2. *Gemophos viverratus*

A literatura para esta espécie é escassa, não permitindo fazer uma caracterização morfológica exata. *G. viverratus* (Fig. 1.6) pode ser encontrada em locais rochosos costeiros da zona intertidal. A sua distribuição ocorre na costa oeste africana, ilhas Canárias e República de Cabo Verde, pertencentes à região biogeográfica da Macaronésia²⁹.



Figura 1.6 - *Gemophos viverratus*. Exemplar recolhido na Praia da Galé, Ilha de São Vicente, Cabo Verde.

As suas dimensões médias comparativamente à *N. lapillus*, são superiores, variando entre 30 a 40 mm. A concha é fusiforme e sólida, sendo visíveis variadas estrias transversais com diferentes padrões de cores (verde, castanho e roxo)³⁰ (Fig. 1.6).

Os indivíduos desta espécie podem ser encontrados até 10 metros de profundidade, em locais rochosos³⁰. Não havendo informação sobre a sua alimentação, podemos inferir que, pertencendo ao género Pisaniidae, são também um predador³¹.

Para os indivíduos de *G. viverratus*, também não é possível uma distinção exterior, contudo, os sistemas reprodutores de ambos os sexos são facilmente diferenciados quando retirados da concha. Nos machos pode ser observado o pênis posterior ao tentáculo ocular direito, que pode atingir até um terço do tamanho do indivíduo sendo facilmente visível a olho nu, bem como a vesícula seminal, e nas fêmeas a glândula capsular de cor branca. Nos

machos, o pênis tem uma ponta que está envolvida por uma bainha e, também, um ducto peniano no seu interior que o esperma percorre até ser expelido para a fêmea. O vaso deferente (continuação do ducto após saída do pênis) tem uma configuração linear ficando torcido até à formação da próstata distal. A próstata distal é ligeiramente elevada no manto quando atinge o seu completo desenvolvimento. A partir da próstata, o vaso deferente prossegue de forma linear percorrendo o lado direito do manto até ao reto²⁹ (Fig 1.7 B). O desenvolvimento de *imposex* nas fêmeas (Fig. 1.7 C) tem como base o mesmo processo, com a diferença de que o vaso deferente termina na entrada da vulva, ou passa ao lado da sua abertura (como explicado no esquema abaixo).

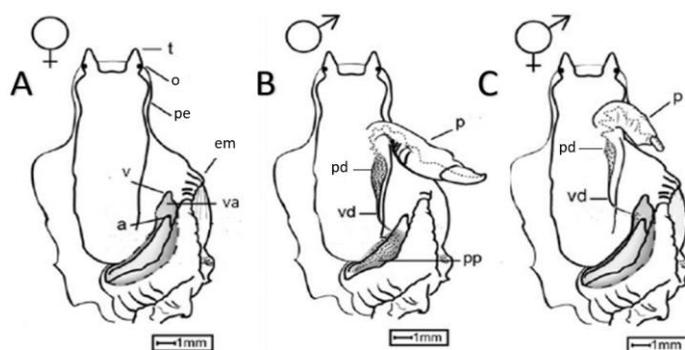


Figura 1.7 - *Gemophos viverratus*. A- Fêmea com cavidade do manto exposta. B- Macho com a cavidade do manto exposta. C- Fêmea com *imposex*. Abreviações: a, anus; em, extremidade do manto; o, olho; pe, pé; p, pênis; pd, próstata distal; pp, próstata proximal; t, tentáculo; va, vagina; vd, vaso deferente; v, vulva. Imagem adaptada de Lopes-dos-Santos et al. (2014)³³

Para expressar a morfologia do *imposex* nesta espécie, foi usado como base o esquema descrito para a espécie *C. cecillei* da mesma família (Pisaniidae), primeiramente apresentado e descrito por Shi et al. (2005)³² e, posteriormente, adaptado por Lopes-dos-Santos et al. (2014)³³ para *G. viverratus*. O esquema está dividido em 6 estádios, sendo que cada estádio tem três tipos de desenvolvimento diferentes (a, b e c) (Fig. 1.8).

Estádio 1

Tipo a: Atrás do tentáculo ocular direito, encontra-se um pequeno pênis sem ducto peniano ou bainha peniana;

Tipo b: desenvolvimento de vaso deferente no local de crescimento de pênis;

Tipo c, c*: desenvolvimento de vaso deferente com início na abertura (tipo c) ou passagem ao lado (tipo c*) da vulva.

Estádio 2

Tipo a: pénis com ducto peniano a fechar, ou fechado atrás do tentáculo ocular direito;

Tipos b, b*: desenvolvimento de vaso deferente atrás do tentáculo ocular direito e na abertura (tipo b) ou passagem ao lado (tipo b*) da vulva;

Tipos c, c*: pequeno pénis sem ducto peniano ou pequeno cume e um vaso deferente na abertura (tipo c) ou passagem ao lado (tipo c*) da vulva.

Estádio 3

Tipo a: pénis, sem bainha, com ducto peniano dando continuação ao vaso deferente;

Tipos b, b*: vaso deferente contínuo a partir do tentáculo ocular direito até à abertura (tipo b) ou passagem ao lado (tipo b*) da vulva.

Tipo c, c*: pénis, sem bainha, com ducto peniano com continuação como vaso deferente e desenvolvimento de vaso deferente desde a abertura (tipo c) ou ao lado (tipo c*) da vulva.

Estádio 4

Tipo 4, 4*: pénis com bainha (geralmente) e com um vaso deferente contínuo desde o pénis até à abertura da vulva (tipo 4) ou passando ao lado (tipo 4*). Neste estágio começa a ser visível o desenvolvimento da próstata distal com localização anterior à do pénis.

Estádio 5

Tipo a: a vagina diminui, a vulva fica ausente e pode ser encontrada na vulva uma extensão da próstata.

Tipo a*: extensão da próstata perto da abertura da vulva, no entanto a vagina é completa e a vulva continua com uma abertura.

Tipo b: tecido do vaso deferente prolifera-se, originando a oclusão da abertura da vulva, podendo formar “nódulos” ou “bolhas”.

Tipo b*: proliferação de células na região vaginal (vulva continua aberta), origina formação de nódulos e bolhas que causam o bloqueio ou contorção do oviduto.

Tipo c, c*: continuidade do vaso deferente na abertura (tipo c) ou ao lado (tipo c*) da vulva e fecho ontogénico do oviduto paleal incompleto.

Estádio 6

Tipos a, a*, b e b*: diferenciam-se do estágio 5 devido à presença no oviduto de cápsulas de ovos abortados.

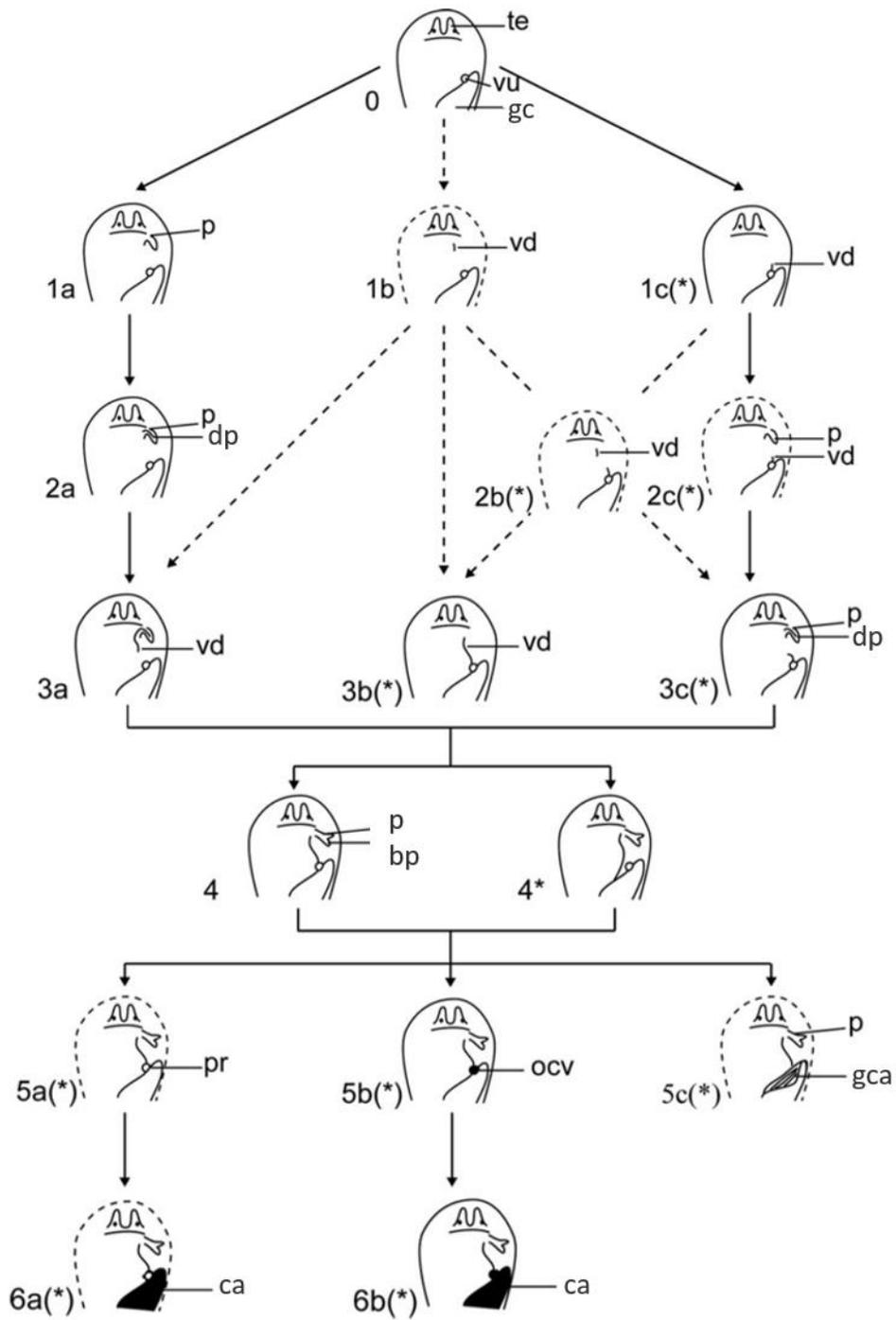


Figura 1.8 - *Gemophos viverratus*. Estádios com tracejado não foram encontrados no estudo de Lopes-dos-Santos et al. (2014)³⁴. Abreviações: bp, bainha do pênis; ca, cápsulas abortadas; dp, ducto peniano; gc, glândula capsular; gca, glândula capsular aberta; ocv, oclusão da vulva; p, pênis; pr, próstata; t, tentáculo; vd, vaso deferente. Esquema adaptado de Lopes-dos-Santos et al. (2014)³³

1.3. Legislação

O impacto da poluição por TBT no colapso da indústria comercial das ostras em França, foi o ponto de partida para o governo francês ser o primeiro a regular o uso de tintas anti-vegetativas. Assim, em 1982 proibiram o uso de OT-AFS com mais de 3% de TBT em navios menores de 25 m, em áreas de intensa produção de ostras e, posteriormente, a toda a costa¹⁷. É importante referir, que após a proibição do uso de tintas contendo TBT verificou-se uma normalização do crescimento e reprodução das culturas de ostras³⁴. A descoberta do imposex na costa Inglesa¹⁹, também associada à poluição por TBT, levou à adoção de uma legislação semelhante em 1987, nos Estados Unidos da América em 1988, sendo seguidos pela Suíça, Áustria, Canadá, Alemanha, Itália, Japão entre outros^{35,36}.

A problemática do TBT foi levantada em 1988 no Comité de Protecção Ambiental Marinha (MEPC) da Organização Marítima Internacional (IMO), após serem pedidas à IMO medidas legais para restringir o uso de OT-AFS atendendo aos estudos disponíveis sobre os efeitos do TBT nos ecossistemas marinhos³⁷.

A 21 de dezembro de 1989, a Comissão Europeia (CE) alterou, pela oitava vez, a Diretiva 76/769/EEC³⁸, introduzindo a Diretiva 89/677/CEE³⁹ que proibia a aplicação de tintas anti-vegetativas com TBT em embarcações inferiores a 25m e outras estruturas aquáticas. Esta diretiva foi transposta para a legislação Portuguesa em 1993 (Decreto Lei 54/93)⁴⁰. Assim, *“não são admitidos como substâncias e componentes de preparações destinadas a ser utilizadas para impedir a fixação de microrganismos, plantas ou animais: a) Aos cascos de embarcações de comprimento de fora a fora, tal como definido pela norma ISO 8666, inferior a 25 metros; b) As gaiolas, flutuadores, redes e a qualquer outra aparelhagem ou equipamento utilizado em piscicultura; c) A qualquer aparelhagem ou equipamento total ou parcialmente imerso. Essas substâncias e preparações: (i) podem ser colocadas no mercado apenas em embalagens de capacidade não inferior a 20 litros, (ii) não podem ser vendidas ao público em geral, mas unicamente aos utilizadores profissionais. Sem prejuízo da aplicação de outras disposições comunitárias em matéria de classificação, embalagem e rotulagem das substâncias e preparações perigosas, a embalagem de tais preparações deve ostentar, de modo legível e indelével, as seguintes menções: «Não utilizar*

em embarcações de comprimento de fora a fora inferior a 25 metros nem em qualquer aparelhagem ou equipamento utilizado em piscicultura.» e «Reservado aos utilizadores profissionais.» Não são admitidos como substâncias e componentes de preparações destinadas a ser utilizadas no tratamento das águas industriais, independentemente do seu uso³⁹.”

Em novembro 1990, a MEPC adotou a Resolução MEPC.46(30) “Medidas para Controlar Possíveis Impactos Adversos Associados ao uso de Compostos de Tributil Estanho em Tintas Anti-Vegetativas”, cujo objetivo consistia em sugerir recomendações de forma a eliminar o uso de TBT-AFS em navios <25 m e proibir o uso de AFS com uma taxa média de dispersão >4 mgTBT.cm⁻².dia. Estas medidas seriam provisórias até a IMO implementar uma proibição e alternativa ao uso das mesmas a nível global³⁵.

Após longas deliberações, na 21^a reunião geral da IMO, em novembro de 1999, com base na Resolução A.895 (21) da MEPC, foi estabelecida a proibição a nível global da aplicação ou reaplicação de OT-AFS com início a 1 de janeiro de 2003 e abolição total a setembro de 2008. Após essa Resolução, a 5 de Outubro de 2001, foi criada a “Convenção Internacional do Controlo de Sistemas Anti Incrustantes Nocivos em Navios” (Convenção AFS) com o objetivo de colocar um fim à problemática de OT-AFS, particularmente o TBT, bem como a prevenção do uso de novos compostos tóxicos⁴¹. A convenção AFS entrou legalmente em força, a setembro de 2008, apenas após a ratificação de 25 estados, que representam um mínimo de 25% da arqueação bruta do transporte de mercadorias mundial.

A CE, antecipando atrasos na implementação desta legislação, e no seguimento da convenção AFS, a 9 de julho de 2002, aprovou a diretiva 2002/62/CE a fim de “*proibir, a partir de 1 de janeiro de 2003, a colocação no mercado e a utilização de compostos organoestânicos para utilização em AFS, em relação a todos os navios independentemente do seu comprimento*”⁴². Posteriormente, a EU adotou a Regulação 782/2003, que “*a partir de 2 de julho de 2003, proíbe os revestimentos que integrem na sua composição TBT ativo a todos os navios com direito a arvorar o pavilhão de um Estado-Membro, e cujo sistema anti vegetativo tenha sido aplicado, alterado ou substituído após essa data*”⁴². Além disso, a EU determinou que partir de janeiro de 2008 “*os navios cujos cascos tenham revestimentos que integrem TBT ativo na sua composição não poderão entrar nos portos comunitários*”⁴².

É importante mencionar neste capítulo a convenção de OSPAR, em 1992, para a Proteção do ambiente marinho no Nordeste Atlântico. Os países pertencentes à OSPAR incluem Finlândia, França, Bélgica, Dinamarca, Holanda, Islândia, Alemanha, Irlanda, Portugal, Noruega, Suíça, Suécia, Luxemburgo, Reino Unido e a União Europeia. As Partes Contratantes da Convenção OSPAR têm por obrigação “tomar todos os passos possíveis para prevenir e eliminar poluição e devem assegurar as medidas necessárias para proteger as áreas marinhas contra os efeitos adversos de atividades antropogénicas para salvaguardar a saúde e conservar os ecossistemas marinhos e, quando possível, restaurar áreas marinhas que tenham sido afetadas negativamente”⁴³.

A proibição de tintas com TBT foi adotada pela maioria dos países Europeus (incluindo Portugal), da América e alguns na Ásia. A maioria dos países Africanos ainda não são signatários da Convenção AFS em 2019 como Guiné, Angola, Gana, e a República de Cabo Verde, que tem a maior relevância para este trabalho⁴⁴.

1.4. Objetivos e fundamentos da dissertação

O principal objetivo desta dissertação passa pela monitorização da evolução do *imposex*, causada pela poluição por TBT, em dois países diferentes: Portugal e Cabo Verde. É importante realçar que em Portugal existe legislação que interdita o uso de tintas anti-vegetativas com TBT e, em Cabo Verde, não existe qualquer legislação nacional ou internacional aplicada até ao momento que proíba a utilização deste biocida.

Este estudo será dividido em quatro capítulos: um capítulo introdutório, dois capítulos de desenvolvimento com os trabalhos de pesquisa realizados e um último capítulo para as considerações finais.

O primeiro capítulo consiste, primeiramente, numa descrição da problemática da poluição por TBT no ambiente marinho. Seguidamente é apresentado o *imposex*, como um dos efeitos nefastos desta contaminação, expondo e descrevendo as duas espécies estudadas (*Nucella lapillus* e *Gemophos viverratus*). Posteriormente, é apresentada uma perspetiva cronológica das políticas e legislações formuladas e implementadas respeitantes à utilização

de tintas OT-AF. Numa fase final deste capítulo, são descritas de forma pormenorizada as duas áreas de estudo: Ria de Aveiro (Portugal) e São Vicente (República de Cabo Verde).

No capítulo dois, é descrito o processo de monitorização realizado na ilha de São Vicente, na República de Cabo Verde utilizando a espécie *G. viverratus*. Todo o processo de recolha e análise da amostragem é descrito neste capítulo, assim como é feita uma análise evolutiva dos níveis de *imposex*, comparativamente ao último estudo realizado, em 2012.

No capítulo três, é apresentado o trabalho realizado na Ria de Aveiro, em Portugal utilizando como bioindicador a espécie *N. lapillus*. Os níveis de *imposex* também serão analisados numa perspetiva cronológica tendo por base dados da última monitorização realizada em 2013 e os dados recolhidos para o desenvolvimento deste estudo, 2018 e 2019.

Por fim, no capítulo quatro, são elaboradas as considerações finais, tendo em conta que as discussões gerais para cada trabalho de pesquisa estão descritas em cada um dos capítulos correspondentes (2 e 3). Neste capítulo é realizada uma reflexão mais ampla relativamente aos impactos dos diferentes níveis de *imposex* identificados ao longo da análise dos dados.

1.5. Caracterização das áreas de estudo

1.5.1. Ria de Aveiro, Portugal

A Ria de Aveiro (40°38'N, 8°45'W) está localizada na costa noroeste de Portugal, sendo a cidade de Aveiro o município principal^{45,46}.

A ria é um sistema estuarino com uma profundidade média baixa, cerca de 1 m e uma profundidade máxima de aproximadamente 30 m (na embocadura). Nos canais de navegação podem, também, ser observadas profundidades elevadas, com cerca de 10 m, que são mantidas artificialmente através de dragagens de manutenção. A sua área varia entre 83 km² na preia-mar e 66 km² na baixa-mar. Tem um comprimento de 45 km e uma largura máxima, na zona central, de 8,5 km⁴⁶.

A topografia da Ria consiste em 4 canais principais, em que todos eles têm uma fonte de água doce (Fig. 8): 1 que se estende na direção Este-Oeste (Espinheiro) e 3 que se estendem na direção Norte-Sul (São Jacinto, Mira e Ílhavo), sendo que Mira e Ílhavo são canais estreitos e pouco profundos que correm para sul e, São Jacinto, largo e profundo, que corre para norte^{46,47}.

A dinâmica da Ria é governada pelas forças da maré oceânica, que se propagam de Sul para Norte, penetrando apenas pela embocadura e dominando dessa forma o hidrodinamismo da Ria de Aveiro, que apresenta, assim, uma elevada sazonalidade. A maré é predominantemente semidiurna e modelada por um ciclo quinzenal bastante importante, pois está relacionado com o evento de marés vivas e marés mortas. A sua maré é classificada como mesotidal (com uma amplitude média de 2m), na embocadura a amplitude varia entre 0.6 m em maré morta e 3.2 m em maré viva. O Rio Vouga tem a maior descarga na ria, contribuindo com cerca de 2/3 da água doce da entrada média total da ria, seguindo-se o rio Antuã⁴⁶.

As potenciais fontes de TBT na Ria de Aveiro são as docas e marinas, que estão localizadas numa extensão de 9 km ao longo do canal de navegação principal, desde a embocadura até à cidade de Aveiro. Também os portos são uma fonte de contaminação: no lado oeste do canal de São Jacinto existe uma construção naval para navios com um peso até 2000 toneladas e no lado sul um terminal de porto comercial e um terminal de porto químico. Em Aveiro existem também as docas, um terminal de porto comercial e de pesca. No final do canal de São Jacinto e na zona ocidental e oriental do canal de Mira existem 3 marinas com capacidade até 100 barcos, não esquecendo os pequenos barcos de pesca ou para atividades lúdicas que se encontram ao longo de todos os canais da Ria de Aveiro⁴⁷. Previamente à implementação das legislações relacionados com o uso de OT-AFS em 1993, a costa portuguesa, inclusive a ria, estava contaminada, com as populações de *Nucella lapillus* a apresentarem elevados nível de imposexo^{48,49}.

Apenas em 2003, após a implementação da regulação (CE) N° 782/2003, relativa à proibição de compostos organoestânicos em navios, ocorreram diminuições significativas do nível de imposexo na Ria de Aveiro⁵⁰, algo que se verificou, também, em estudos realizados ao longo de toda a costa portuguesa^{51,52}. Apesar das diminuições significativas verificadas

nas várias campanhas de monitorização realizadas ao longo da Ria de Aveiro, ainda não foi atingido um total desaparecimento de *imposex* e do TBT e uma recuperação total da população de *Nucella lapillus*. Por essa mesma razão, é fundamental a execução de estudos de monitorização de *imposex* periódicos, pois, apenas dessa forma é possível estudar a capacidade de permanência do TBT nos ecossistemas marinhos.

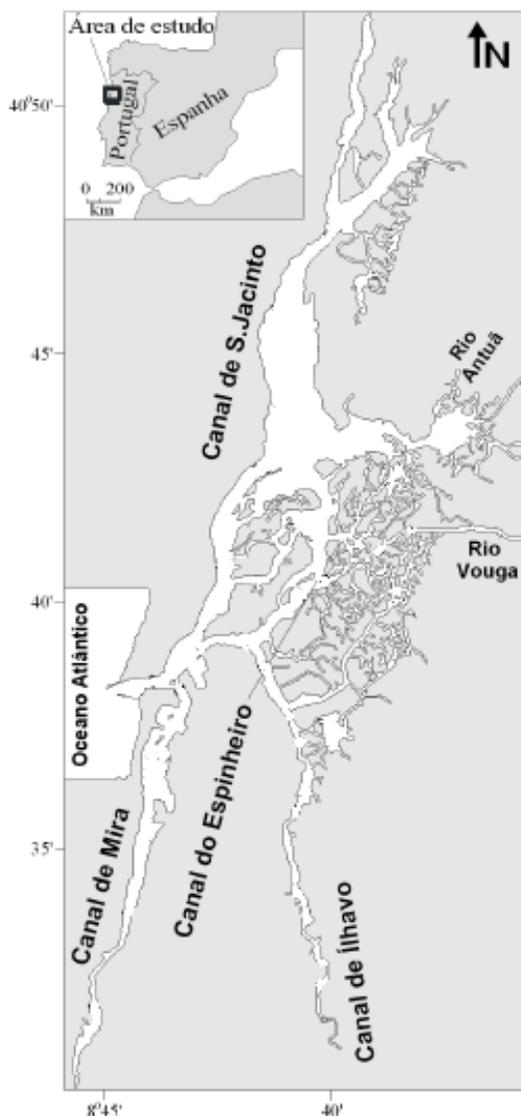


Figura 1.9 - Mapa da Ria de Aveiro, Portugal. Adaptado de Barroso et al. (2000)⁴⁵

1.5.2. Cabo Verde

A República de Cabo Verde (15.02N, 23.34W), é constituída por 10 ilhas e 8 ilhotas de origem vulcânica, com uma área total de 4033 km² (Fig. 1.9)⁵³. Tem uma costa de 965 km, está localizada na costa ocidental Africana (a 500-700 Km da costa do Senegal) e tem uma Zona Económica Exclusiva de 734 km². Pertence a uma região que inclui outros 3 arquipélagos (Canárias, Açores e Madeira), neste caso, região biogeográfica da Macaronésia. As ilhas da República de Cabo Verde estão divididas em ilhas de Barlavento [Santo Antão (SA), São Vicente (SV), Santa Luzia (LZ), Ilhéus Raso e Branco (IR), São Nicolau (SN), Sal (SL) e Boavista (BV)] e Sotavento [Maio (MO), Santiago (ST), Fogo (FG), Brava (BR), Ilhéus Grande, de Cima e Luís Carneiro (IG)]⁵⁴.

O arquipélago está sob influência de fortes correntes: a corrente fria das Canárias (Corrente Equatorial Norte) gira para Oeste e Nordeste, e a contracorrente equatorial proveniente do Sul que se dirige para Noroeste. Devido à interação das duas massas de água, ocorrem formações de frentes hidrológicas que reúnem condições ideais para concentrações de biodiversidade marinha. Assim sendo, as ilhas são consideradas *hotspots* de biodiversidade, tanto de fauna como de flora, porém, têm uma abundância reduzida com um potencial de recurso haliêutico baixo^{55,54}.

Sendo um país subtropical, podem ser consideradas 2 estações: quente (julho a novembro com uma temperatura média da água a rondar 26-27°C) e moderada (dezembro a junho com a água entre 22-23°C)⁵⁶.

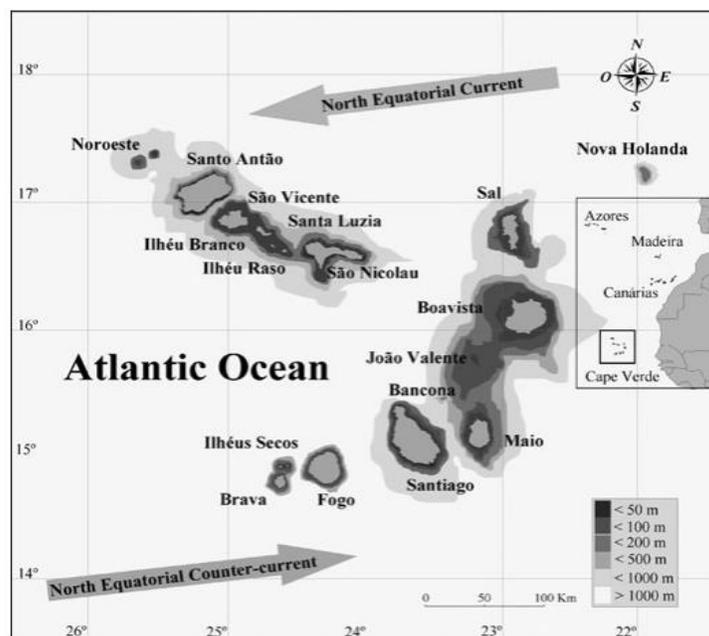


Figura 1.10 - Mapa da República de Cabo Verde. Retirado de Medina et al. (2007)⁵²

1.5.2.1. São Vicente, Cabo Verde

São Vicente é a segunda ilha mais populosa da República de Cabo Verde, com um comprimento de 24 km, largura máxima de 16 km e uma área de 228 km². É considerada uma ilha pouco acidentada, com o ponto mais alto a 774 m de altitude, o Monte Verde. Esta ilha tem cerca de 78000 habitantes, sendo que a maioria se encontra na capital, a cidade de Mindelo⁵⁷. O clima é bastante seco, com uma temperatura média anual de 24°C e, devido à baixa precipitação, a água para a população provém da dessalinização da água do mar⁵⁸.

A cidade de Mindelo encontra-se cercada pela baía do Porto Grande, que tem o porto mais importante do país. Construído em 1962, teve um grande impacto no desenvolvimento económico da cidade e do país. Desde 1838 tornou-se um importante ponto de paragem para rotas transatlânticas dos britânicos, com numerosas empresas de carvão a estabelecerem-se no Porto Grande. Tem 2 km de raio, profundidade entre os 11 e 30 metros, e a sua localização tem boas condições, pois está protegida de ventos e correntes, oferecendo excelentes condições de entrada e abrigo a embarcações. É um porto certificado com o código internacional para a proteção de navios e instalações portuárias (ISPS Code), implementado



Figura 1.11 - Mapa topográfico da ilha de São Vicente, Cabo Verde. Adaptado de Ancochea et al. (2010)¹¹⁵

pela IMO⁵⁹. Na proximidade da baía, para além do Porto Grande, existem duas marinas (Marina Mindelo e Sport Fishing Club), dois estaleiros (Cabnave e Wilson) e várias empresas industriais muito importantes para o país (ENAPOR, ELECTRA, SHELL, MOAVE, ENACOL).

A República de Cabo Verde tem vindo a crescer a nível socioeconómico nos últimos anos através do aumento de turismo, que por sua vez implica um aumento da urbanização, amplificando a necessidade de melhoria em transportes e serviços nas cidades. Estes desenvolvimentos têm vários benefícios para o país, no entanto, desencadeiam um aumento na preocupação ambiental devido à reduzida capacidade de resposta e gestão do país⁶⁰. Dos principais problemas ambientais salientam-se défices no tratamento de resíduos domésticos, industriais, hospitalares e saneamento básico. Também a má gestão do tratamento de resíduos sólidos e a sua deposição não controlada leva a que, muitas vezes, terminem no mar.

O desenvolvimento socioeconómico reflete-se, também, no crescimento do tráfego marítimo-portuário no Porto Grande localizado na cidade de Mindelo. Considerado o maior Porto do País tem, claramente, um impacto positivo na economia da cidade e do país, pois está localizado numa posição central no tráfego marítimo mundial. Como referido acima, a República de Cabo Verde não ratificou a convenção AFS, permitindo a navegação de navios

com OT-AFS. O aumento do tráfego aliado à utilização de TBT pode ter implicações prejudiciais para o equilíbrio do ecossistema marinho. Estudos relacionados com a problemática da poluição por TBT em países Africanos são escassos, originando uma grande lacuna de informação, no entanto, já foram realizados estudos na Tunísia^{61,62,63,64}, Marrocos⁶⁵, Gana⁶⁶ e África do Sul⁶⁷. Para Cabo Verde, foi realizado um estudo em 2012 para a espécie *Gemophos viverratus*, que demonstrou níveis de *imposex* bastante elevados, com fêmeas a atingir a esterilidade consoante a proximidade ao Porto Grande^{33,68}.

Estudos de monitorização são de extrema importância em casos que comprometem a sobrevivência da população, como é o caso da ilha de São Vicente em Cabo Verde. Apesar da não ratificação do país na convenção AFS, é cada vez maior a percentagem de barcos provenientes de países signatários da convenção que circulam no Porto Grande, para além de que, são cada vez mais utilizadas tintas alternativas ao uso de OT-AFS. Desta forma, é expectável que em 2019, os níveis de *imposex* tenham diminuído na ilha de São Vicente.

1.6. Referências bibliográficas

1. Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C. & Wood, R. J. K. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surf. Coatings Technol.* **201**, 3642–3652 (2006).
2. Yebra, D. M., Kiil, S. & Dam-Johansen, K. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75–104 (2004).
3. Reise, K., Gollasch, S. & Wolff, W. J. Introduced marine species of the North Sea coasts. *Helgolander Meeresuntersuchungen* **52**, 219–234 (1998).
4. Rascio, V. J. D. Antifouling coatings: Where do we go from here. *Corros. Rev.* **18**, 133–154 (2000).
5. Omae, I. Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry* **17**, 81–105 (2003).
6. Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R. & Hertel, W. M. Economic impact of

- biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**, 87–98 (2011).
7. Bennett, R. F. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. in *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant* (ed. De Mora, S. J.) 21–61 (Cambridge University Press, 1996). doi:10.1017/CBO9780511759772.003
 8. Dobson, S. & Cabridenc, R. *Environmental Health Criteria 116: tributyltin compounds*. (1990).
 9. de Mora, S. J. Foreword. in *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (eds. Arai, T., Harino, H., Ohji, M. & Langston, W. J.) 5–7 (Springer Japan, 2009). doi:10.1007/978-4-431-85709-9
 10. Kiil, S., Weinell, C. E., Pedersen, M. S. & Dam-Johansen, K. Analysis of self-polishing antifouling paints using rotary experiments and mathematical modeling. *Ind. Eng. Chem. Res.* **40**, 3906–3920 (2001).
 11. Alzieu, C. Biological effects of tributyltin on marine organisms. in *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant* (ed. De Mora, S. J.) 167–211 (Cambridge University Press, 1996). doi:10.1017/CBO9780511759772.002
 12. Champ, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.* **258**, 21–71 (2000).
 13. Abbott, A., Abel, P. D., Arnold, D. W. & Milne, A. Cost-benefit analysis of the use of TBT: The case for a treatment approach. *Sci. Total Environ.* **258**, 5–19 (2000).
 14. Filipkowska, A., Kowalewska, G. & Pavoni, B. Organotin compounds in surface sediments of the Southern Baltic coastal zone: A study on the main factors for their accumulation and degradation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 2077–2087 (2014).
 15. Hallers-Tjabbes, C. C. T., Kemp, J. F. & Boon, J. P. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: Relation to shipping traffic intensities. *Mar. Pollut. Bull.* **28**, 311–313 (1994).
 16. Ruiz, J. M., Bachelet, G., Caumette, P. & Donard, O. F. X. Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France.

- Environ. Pollut.* **93**, 195–203 (1996).
17. Alzieu, C. Environmental impact of TBT: The French experience. *Sci. Total Environ.* **258**, 99–102 (2000).
 18. Galante-Oliveira, S. Determinant factors for the use of imposex in TBT pollution monitoring. (Universidade de Aveiro, 2010).
 19. Blaber, S. J. M. The occurrence of a Penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *nucella lapillus* (L.). *J. Molluscan Stud.* **39**, 231–233 (1970).
 20. Smith, B. S. Sexuality in the american mud snail, *nassarius obsoletus* say. *J. Molluscan Stud.* **39**, 377–378 (1971).
 21. Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Pascoe, P. L. & Burt, G. R. The use of the dogwhelk, *nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **67**, 507–523 (1987).
 22. Laranjeiro, F., Beiras, R. & Barroso, C. The use of the biomarker imposex to assess the environmental status of aquatic ecosystems regarding tributyltin pollution. *Ecol. Indic.* **95**, 1068–1076 (2018).
 23. Barroso, C. M., Moreira, M. H. & Gibbs, P. E. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **201**, 221–232 (2000).
 24. Gibbs, P. E. *Biological effects of contaminants : use of imposex in the dogwhelk (Nucella lapillus) as a bioindicator of tributyltin pollution.* (International Council for the Exploration of the Sea, 1999).
 25. Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A. & Mintoff, B. Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: Some further observations. *Environ. Int.* **28**, 743–749 (2003).
 26. Titley-O’Neal, C. P., Munkittrick, K. R. & MacDonald, B. A. The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring* **13**, 2360–

- 2388 (2011).
27. J H, C. Dog whelks: an introduction to the biology of *Nucella lapillus*. *F. Stud.* **6**, 291–360 (1985).
 28. Schøyen, M. *et al.* Levels and trends of tributyltin (TBT) and imposex in dogwhelk (*Nucella lapillus*) along the Norwegian coastline from 1991 to 2017. *Marine Environmental Research* **144**, 1–8 (2019).
 29. Lopes-Dos-Santos, R. M. A., Almeida, C., De Lourdes Pereira, M., Barroso, C. M. & Galante-Oliveira, S. Morphological expression and histological analysis of imposex in *Gemophos viverratus* (Kiener, 1834) (Gastropoda: Buccinidae): A new bioindicator of tributyltin pollution on the West African coast. *J. Molluscan Stud.* **80**, 412–419 (2014).
 30. Brunetti, M. & Della Bella, G. La famiglia Buccinidae Rafinesque, 1815 nel Plio-Pleistocene italiano: i generi *Aplus* De Gregorio, 1884, *Engina* Gray, 1839 e *Gemophos* Olsson & Harbinson, 1953 (Gastropoda). *Boll. Malacol.* **50**, 11–32 (2014).
 31. Vermeij, G. J. *The Cantharus Group of Pisaniine Buccinid Gastropods: Review of the Oligocene to Recent Genera and Description of Some New Species of Gemophos and Hesperisternia*. *Cainozoic Research* **4**, (2006).
 32. Shi, H., Huang, C., Yu, X. & Zhu, S. An updated scheme of imposex for *Cantharus cecillei* (Gastropoda: Buccinidae) and a new mechanism leading to the sterilization of imposex-affected females. *Mar. Biol.* **146**, 717–723 (2005).
 33. Lopes-dos-Santos, R. M. A., Galante-Oliveira, S., Lopes, E., Almeida, C. & Barroso, C. Assessment of imposex and butyltin concentrations in *Gemophos viverratus* (Kiener, 1834), from São Vicente, Republic of Cabo Verde (Africa). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 10671–10677 (2014).
 34. Alzieu, C. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. *Mar. Environ. Res.* **32**, 7–17 (1991).
 35. Senda, T. IMO's Effort. in *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (eds. Arai, T.,

Harino, H., Ohji, M. & Langston, W. J.) 24–26 (Springer Japan, 2009).

doi:10.1007/978-4-431-85709-9

36. Sonak, S., Pangam, P., Giriyan, A. & Hawaldar, K. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. *J. Environ. Manage.* **90**, S96–S108 (2009).
37. International Maritime Organization. Marine Environment Protection Committee (MEPC). Available at:
<http://www.imo.org/en/MediaCentre/MeetingSummaries/MEPC/Pages/Default.aspx>.
38. Commission, E. Council Directive 76/769/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. *Off. J. L* **262**, 201–203 (1976).
39. Commission, E. Council Directive 89/677/EEC of 21 December 1989 amending for the eighth time Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to restrictions on the marketing and use of certain. *Off. J. L* **398**, 19–23 (1989).
40. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais. Decreto-Lei n.º 54/93. *Diário da República Série I-A*, 843–844 (1993).
41. Champ, M. A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 935–940 (2003).
42. Commission, E. Commission Directive 2002/62/EC of 9 July 2002 adapting to technical progress for the ninth time Annex I to Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restricti. *Off. J. L* **183**, 58–59 (2002).
43. OSPAR Commission. *Quality Status Report 2000*. (2000).
44. International Maritime Organization. Status of Conventions. (2019). Available at:
<http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions/Pages/Default.aspx>

45. Pereira, M. E. *et al.* Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environ. Monit. Assess.* **155**, 39–49 (2009).
46. Dias, J. *et al.* Caracterização sinóptica dos gradientes ambientais na Ria de Aveiro. Parte I: salinidade e temperatura. in *Jornadas da Ria de Aveiro* 248–257 (2011).
47. Barroso, C., H. Moreira, M. & E. Gibbs, P. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **201**, 221–232 (2000).
48. Galante-Oliveira, S. *et al.* Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: Evaluation of legislation effectiveness. *J. Environ. Monit.* **11**, 1405–1411 (2009).
49. Galante-Oliveira, S. *et al.* *Nucella lapillus* L. imposex levels after legislation prohibiting TBT antifoulants: Temporal trends from 2003 to 2008 along the Portuguese coast. *J. Environ. Monit.* **13**, 304–312 (2011).
50. Sousa, A., Matsudaira, C., Takahashi, S., Tanabe, S. & Barroso, C. Integrative assessment of organotin contamination in a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal): Tracking temporal trends in order to evaluate the effectiveness of the EU ban. *Mar. Pollut. Bull.* **54**, 1645–1653 (2007).
51. Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Galante-Oliveira, S. & Barroso, C. Tributyltin pollution biomonitoring under the Water Framework Directive: Proposal of a multi-species tool to assess the ecological quality status of EU water bodies. *Ecol. Indic.* **57**, 525–535 (2015).
52. Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Oliveira, I. B., Galante-Oliveira, S. & Barroso, C. Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast. *Environ. Pollut.* **232**, 411–421 (2018).
53. Monteiro, J. *et al.* Coral assemblages of Cabo Verde: preliminary assessment and description. in *11th International Coral Reef Symposium-2008* 1416–1419 (2008).

54. Medina, A., Brêthes, J. C., Sévigny, J. M. & Zakardjian, B. How geographic distance and depth drive ecological variability and isolation of demersal fish communities in an archipelago system (Cape Verde, Eastern Atlantic Ocean). *Mar. Ecol.* **28**, 404–417 (2007).
55. Benchimol, C., Francour, P. & Lesourd, M. The preservation of marine biodiversity in West Africa, the Case of Cape Verde Islands: proposal of a new biodiversity policy management. in *1st Cape Verde Congress of Regional Development 23* (2009).
56. Freitas, R. The coastal ichthyofauna of the Cape Verde Islands: a summary and remarks on endemism. *Zool. Caboverdiana* **5**, 1–13 (2014).
57. López-Guzmán, T., Borges, O. & Hernandez-Merino, M. Analysis of community-based tourism in Cape Verde. A study on the island of São Vicente. *Anatolia* **24**, 129–143 (2013).
58. Segurado, R., Krajačić, G., Duić, N. & Alves, L. Increasing the penetration of renewable energy resources in S. Vicente, Cape Verde. *Appl. Energy* **88**, 466–472 (2011).
59. ENAPOR. *Guia do Porto Grande*. (2014).
60. Instituto Nacional de Estatística Cabo Verde. *Cabo Verde Statistical Yearbook*. (2015).
61. Abidli, S., Lahbib, Y. & El Menif, N. T. Effects of TBT on the imposex development, reproduction and mortality in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **89**, 139–146 (2009).
62. Abidli, S. *et al.* Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): Imposex induction and sex hormone levels insights. *Ecol. Indic.* **13**, 13–21 (2012).
63. Abidli, S., Lahbib, Y., González, P. R., Alonso, J. I. G. & Trigui El Menif, N. Imposex and butyltin burden in *Bolinus brandaris* (Mollusca, Gastropoda) and sediment from the Tunisian coast. *Hydrobiologia* **714**, 13–24 (2013).

64. Abidli, S., Lahbib, Y., González, P. R., Alonso, J. I. G. & Trigui El Menif, N. Imposex and butyltin burden in *Bolinus brandaris* (Mollusca, Gastropoda) and sediment from the Tunisian coast. *Hydrobiologia* **714**, 13–24 (2013).
65. Lahbib, Y., Abidli, S. & Trigui El Menif, N. Description of imposex and butyltin burden in *Nassarius mutabilis* from the lagoon of Bizerta (northern Tunisia). *Russ. J. Mar. Biol.* **39**, 70–75 (2013).
66. Lemghich, I. & Benajiba, M. H. Survey of imposex in prosobranchs mollusks along the northern Mediterranean coast of Morocco. *Ecol. Indic.* **7**, 209–214 (2007).
67. Nyarko, E. & Evans, S. M. The impacts of tributyltin, pollution and human food gathering on populations of whelks *Thais haemostoma* and *T. nodosa* on the coast of Ghana. in *The coastal zone of West Africa: problems and management* (eds. Evans, S. M., Vanderpuye, C. J. & Armah, A. K.) 93–101 (Penshaw Press, 1997).
68. Marshall, D. J. & Rajkumar, A. Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbours. *Mar. Pollut. Bull.* **46**,

Capítulo 2 – Assessment of imposex in *Gemophos viverratus* from São Vicente (Republic of Cabo Verde): a resurvey in 2019

Abstract

The use of Organotin-based Antifouling Systems (OT-AFS) was globally banned since September 2008 by the “International Convention on the Control of Harmful Antifouling System on Ships” (AFS Convention) under the IMO aegis. However, some countries did not implement restrictions regarding the use of OT-AFS. For instance, the Republic of Cabo Verde never developed national legislation to control OT-AFS, nor did the government ratify the AFS Convention. *Gemophos viverratus* imposex levels were assessed along the São Vicente Island (Cabo Verde) coast in 2019 and compared with data available for 2012, for the same sampling sites, in order to assess the temporal evolution of TBT pollution in this island. The vas deferens sequence index (VDSI), relative penis length index (RPLI), the percentage of females affected with imposex (%I) and the percentage of sterilised females (%S) in 2019 ranged from 0-4.0, 0-84.4%, 0-100% and 0-5.1%, respectively. Populations with the highest levels of imposex were observed inside the Porto Grande Bay, where the major ports, dockyards and marinas are located. The imposex levels in this area remained high since 2012, with no improvement over the last 7 years, which calls for an immediate action by the government to implement a more comprehensive survey to identify the main sources of TBT to the region, especially since the economic growth of Cabo Verde is highly dependent on an healthy marine environment.

Keywords: *Gemophos viverratus*, TBT pollution, Imposex, Cabo Verde, Africa

2.1. Introduction

Tributyltin (TBT) was introduced as a biocide into ship antifouling systems (AFS) in the mid-1960s, which gave rise to a severe pollution scenario around the world¹. One of the adverse effects of TBT pollution is the imposex, defined as the superimposition of male characters (such as a penis and a vas deferens) onto gastropod females, described for about 260 gastropod species worldwide^{2,3}. This phenomenon may lead to female sterilization with consequent population decline or extinction, causing serious ecological impacts⁴. TBT has been subject to progressive legal restrictions in many countries and, more recently, the International Maritime Organization (IMO) adopted the International Convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships (AFS-Convention) that prohibits the global use of TBT-AFS (as well as other hazardous biocides, such as triphenyltin) since September 2008⁵.

Imposex is one of the best examples of a specific and dose dependent biological effect cause by a pollutant, and one of the most reliable biomarkers used in marine pollution monitoring⁶. For this reason, numerous imposex monitoring surveys have been performed along extensive coastal areas around the globe and, in some cases, this biomarker is compulsory in monitoring programs aiming to assess the environmental status of the seas (e.g., OSPAR). Initially, these surveys focused on describing spatial pollution gradients to identify hotspots of pollution, but nowadays the attention has been redirected to the recovery of affected areas following TBT restrictions. Despite the efforts to regulate the use of TBT-AFS throughout the world, some countries never implemented legal restrictions to the use of this antifouling biocide on their territory. This is the case of Republic of Cabo Verde (NW Africa), where there is no national legislation banning this organotin compound, nor did the government ratified the AFS Convention⁷. The first report regarding the status of TBT pollution in this country refers to the levels of imposex and TBT body burden in the caenogastropod *Gemophos viverratus* around São Vicente Island⁸. The present work aims to assess the evolution of TBT pollution in this Island in the recent years, by comparing the levels of imposex in *G. viverratus* in 2012⁸ and 2019 (current work) to evaluate if there was a recovery of imposex during this time lapse.

2.2. Methods

2.2.1. Study area

The Republic of Cabo Verde is an archipelago that belongs to the Macaronesia region which includes Azores, Madeira and Canary Islands, and is constituted by ten volcanic islands and eight islets⁹. The focus of this paper is the island of São Vicente, which comprises the country's main commercial port - Porto Grande - located at the Porto Grande Bay, in the city of Mindelo. This port, an important contributor to the economy of the island, received in 2018 nearly 3.000 ships, corresponding to a total gross tonnage stood (GTs) of 13 million ton¹⁰. Besides this commercial port, the Porto Grande Bay encompasses a fishing port, marinas and important shipyards that increase the number of potential sources of TBT pollution in the area.

2.2.2. Sampling and imposex analysis

Gemophos viverratus sampling was performed along São Vicente coast between April and July 2019. The whelks were collected by hand in intertidal rocky shores across an increasing ship traffic gradient from pristine areas - Calhau (1) and Baía das Gatas (2) - to the Porto Grande Bay - Ninho de Guincho (3), Ponta João Ribeiro (4), Matiota (5) and Praia da Galé (6) (Fig. 2.1). These sites were the same sampled in 2012 by Lopes-dos-Santos et al. (2014) and revisited in the current work in order to assess the temporal evolution of *G. viverratus* imposex levels over the last 7 years (2012-2019), as a proxy to understand the progression of TBT pollution in the area.

After collection, the animals were transported to the laboratory and maintained in aquaria with seawater for at most 3 days. The specimens were narcotized using 7% MgCl₂ in distilled water for 60 min. Shell height was measured with Vernier calipers to the nearest 0.1 mm and then cracked open with a bench vice. Individuals were sexed and dissected under a stereomicroscope. The mean female penis length (FPL), percentage of females affected by imposex %I, the relative penis length index (RPLI = mean female penis length × 100 / mean male penis length) and the vas deferens sequence index (VDSI) were determined for each station. The observed morphological expression of imposex

(VDS scheme) was classified according to the scoring system proposed by Lopes-dos-Santos et al., (2014)⁸ with adjustments shown in Fig. 2.4 that are described in the Results. The penis length was measured using a 1 mm graduated graph paper under the stereomicroscope. Statistical analysis was performed using Prisma 6.0 software.

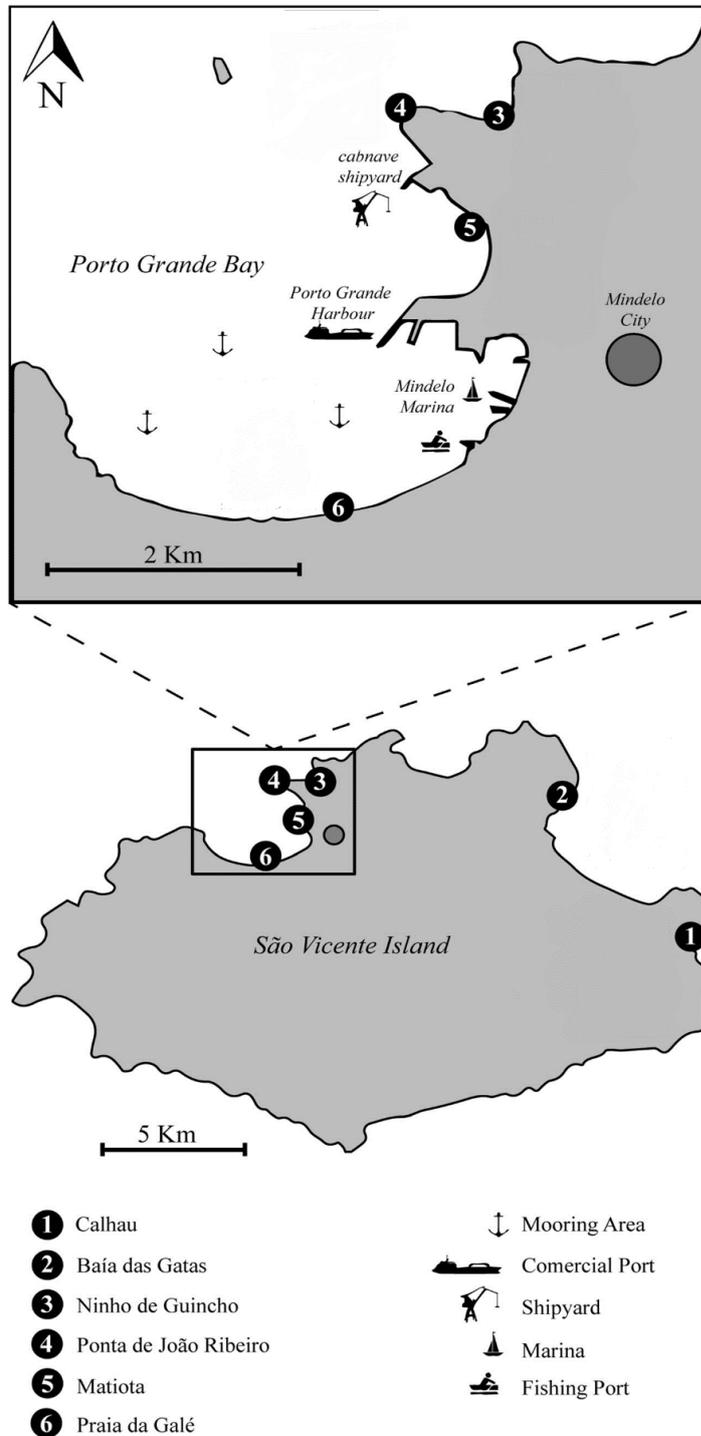


Figure 2.1 - Map of São Vicente island indicating main harbor activities and sampling sites (Stns. 1 to 6). Adapted from Lopes-dos-Santos et al., (2014).

2.3. Results

2.3.1. Imposex levels in 2019

A total of 483 animals (235 females and 248 males) were analyzed in the current study. During the examination of imposex we found 9 females with a VDS stage not previously observed by Lopes-dos-Santos et al., (2014)⁸, corresponding to a small penis bump (almost undetectable, without penial duct) and a short proximal vas deferens tract, referred as stage 2C (if the proximal vas deferens starts at the vaginal opening, as it was the case) or 2C* (if it passes by the vaginal opening - not observed). The VDS scheme was updated accordingly (Fig. 2.4).

There was a drastic difference between the levels of imposex found in each surveyed part of the island. *G. viverratus* females collected in the east coast from Calhau (stn. 1) and Baía das Gatas (stn. 2) were not affected by imposex, but as we approached the Porto Grande, we observed an increasing gradient of imposex. At Ninho de Guincho (Stn. 3) only 3.5% of the females were affected, rendering a RPLI=0 and VDSI=0.04 for this population. The other stations that were closer to pollution sources (ports, dockyards and marinas) presented higher levels of imposex and all the examined females were affected. At João Ribeiro (stn. 4) the RPLI=17.5 and the VDSI=3.5, whilst at Matiota (stn. 5) RPLI=12.9 and VDSI=3.7. Whelks from Praia da Galé (stn. 6) presented the maximum imposex level in the study area - RPLI=84.4 and VDSI=4.0 - and sterilization occurred only at this site, affecting 5.1% of the females (Table 2.1).

2.3.2. Imposex evolution between 2012 and 2019

We compare the data obtained in 2019 with those reported by Lopes-dos-Santos et al. (2014)⁸ for the same sampling sites in 2012. When all sites are analyzed together, by running the Wilcoxon matched-pairs sign rank test, we find no statistical difference between the two dates regarding all the imposex parameters analysed: VDSI ($p=0.50$), RPLI ($p=0.50$), FPL ($p=0.75$) %I ($p=0.50$). When comparisons are made for each site independently, using a Mann-Whitney test, we find a significant increase in VDSI at station 4 ($U= 458.5$, $p<0.01$) and in FPL at station 6 ($U= 260.5$, $p<0.01$), whereas a significant reduction in FPL occurred only at station 5 ($U=154$, $p<0.01$). Sterile females

occurred at Praia da Galé (%S=5.1%) in 2019, a situation that was also reported by the above authors in 2012 at this location (%S=21.4) and also at Matiota (%S=3.2%). This does not necessarily mean that the situation has improved, because we only assigned as sterile those females that presented a clearly visible obstruction of the vulva using a stereo-microscope, whereas the other authors used a more refined method (histological sections) to analyze the reproductive tract of the females.

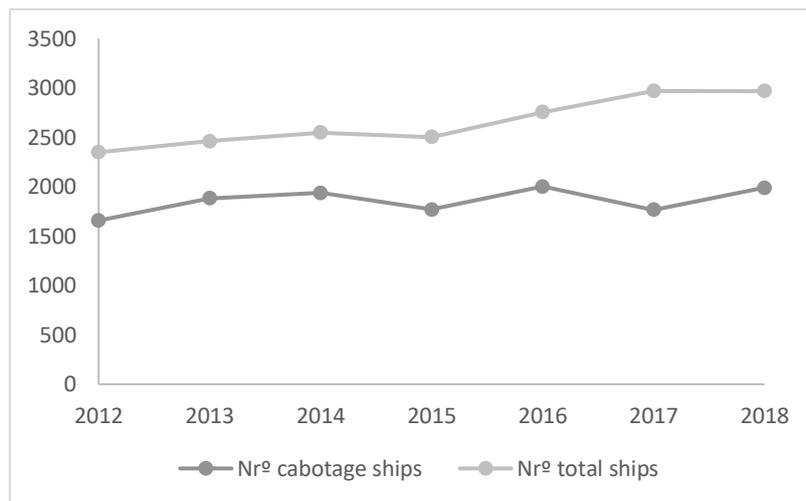


Figure 2.2 - Ship traffic activity in Porto Grande harbor between 2012 and 2018 expressed in terms of total numbers of ships entered and number of cabotage ships. Data obtained from ENAPOR, Portos de Cabo verde website (<http://www.enapor.cv/page/homepage>).

Table 2.1 – Levels of imposex found in the study area in 2013 (Lopes-dos-Santos et al., 2014)⁸ and the current study (2019). Number of males (N_M) and females (N_F) with respective mean shell heights (SH), female penis length (FPL); relative length index (RPLI); percentage of affected females (%I); relative penis length index (RPLI) and vas deferens sequence index (VDSI). Mean values are displayed with the respective standard deviation as “mean ± s.d.” for FPL and VDSI.

St. code	Coordinates	N _M		N _F		SH _M		SH _F		FPL		%I		RPLI		VDSI	
		2012	2019	2012	2019	2012	2019	2012	2019	2012	2019	2012	2019	2012	2019	2012	2019
1.	16° 51' 8.20 N 24° 51' 55.63 W	22	24	23	26	31.6±2.0	33.0±3.8	27.5±3.6	33.6±2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2.	16° 54' 20.03 N 24° 54' 14.86 W	23	28	20	36	33.3±2.2	27.1±3.0	29.9±1.1	27.1±2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3.	16° 54' 30.93 N 24° 59' 25.29 W	20	46	26	57	30.2±2.1	33.3±6.1	28.0±2.9	28.8±4.6	0.0	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	0.04±0.2
4.	16° 54' 19.35 N 24° 59' 56.19 W	27	34	49	29	29.3±3.5	33.0±2.6	29.2±3.4	31.1±2.7	1.3±1.4	1.8±1.2	98	100	11.4	17.5	2.9±1.1	3.5±1.0
5.	16° 53' 51.74 N 24° 59' 35.11 W	18	51	31	49	29.4±2.3	30.3±2.1	27.6±2.4	28.9±1.8	2.1±1.3	1.3±0.6	100	100	18.2	12.9	3.7±0.7	3.7±0.6
6.	16° 52' 36.43 N 24° 59' 55.80 W	37	65	28	38	28.1±2.7	29.6±3.2	26.4±2.0	26.5±3.1	5.2±2.0	7.2±2.2	100	100	54.6	84.4	4.1±1.8	4.0±0.3

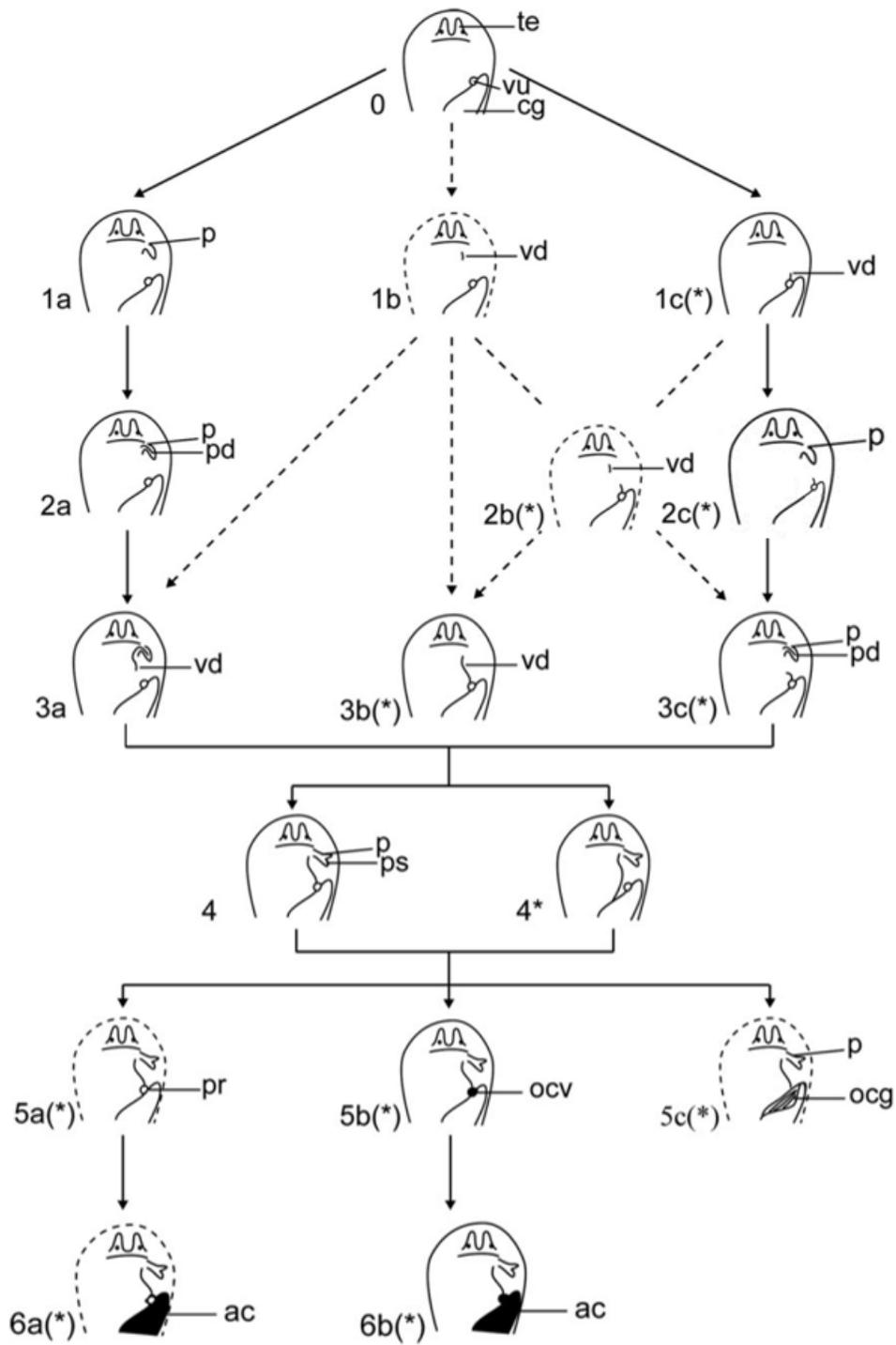


Figure 2.3 - *Gemophos viverratus*. Imposex development scheme adapted from the one proposed by Lopes-dos-Santos et al., 2014⁸ for *Gemophos viverratus*. Dashed drawings refer to stages that were not observed in the present work. Abbreviations: ac, aborted capsules; cg, capsule gland; obc, open bursa copulatrix; ocg, open capsule gland; ocv, occlusion of the vulva; p, penis; pd, penis duct; pr, prostate; ps, penis sheath; te, tentacle; vd, vas deferens; vu, vulva

2.4. Discussion

Imposex is a robust biomarker of TBT pollution and many caenogastropod species have been routinely used as bioindicators in monitoring programs across the coasts of Europe (ex.: *Nucella lapillus*, *Tritia reticulatus*, *Buccinum undatum*), North America (ex.: *Nucella lapillus*, *Tritia obsoleta*, *Nucella emarginata*), South America (*Stramonita haemastoma*, *Stramonita rustica* e *Thaisella chocolata*), Asia and Oceania (ex.: *Reistia clavigera*, *Tylothais virgata*, *Reishia luteostoma*) and Africa (ex.: *Hepaplex trunculus*, *Bolinus brandaris*, *Nassarius kraussianus*)¹¹. *Gemophos viverratus* was proposed as a new bioindicator of TBT pollution for the Macaronesia and west coast of Africa by Lopes-dos-Santos et al., (2014)¹². These authors proved experimentally that TBT could induce imposex in this species and showed that the degree of imposex is significantly correlated with the level of TBT environmental contamination. Moreover, they demonstrated that this species presents a suitable sensitivity to describe ship traffic gradients in the coast of S. Vicente. These evidences warrant the use of *G. viverratus* imposex to track spatial and temporal trends of TBT pollution in this island, which is the main purpose of the current work. Our data corroborate the results of Lopes-dos-Santos et al., (2014)⁸ obtained in 2012, as both describe identical increasing gradients of imposex from pristine areas towards the Porto Grande bay, across common sampling stations (Table 2.1). Remarkably, we found that the levels of imposex remained very similar over the last 7 years at each surveyed site. This contrasts with the dominant declining trend reported for other bioindicators in other parts of the world following the implementation of the IMO AFS convention in 2008, or other similar regulations adopted at a national scale^{13,14,15,16}. It is thus important to discuss the reasons why there wasn't any improvement of *G. viverratus* between 2012 and 2019. It could happen that the animals examined in this study were old and, assuming that imposex is an irreversible condition, they would keep the same grade of affliction for so many years. However, despite the lack of information regarding the longevity of the species and the age of *G. viverratus* used in the current survey, it is unlikely that these small size type of gastropods belong to the same cohorts sampled in 2012 by Lopes et al (2014)⁸. Hence, it is plausible to conceive that imposex levels remained high because TBT pollution did not decline between 2012 and 2019, which is indicative of continuing inputs of this organotin compound into the study area. It is

important, therefore, to identify the current sources of TBT into the Porto Grande Bay. Although Cabo Verde did not ratify the AFS Convention, ships coming from abroad are in most cases subjected to this convention and are not expected to carry organotin-AFS. It is important to note, however, that from the total of ships entering Porto Grande, 70% belong to cabotage vessels that may still legally use TBT paints in the country. It is important to stress that during this period there was no decrease of naval or commercial traffic at the Porto Grande (Fig. 2.3).

Fishing boats, leisure boats and shipyards are possible sources of TBT pollution to the region as well. Nevertheless, according to the research that we performed around the island, no official shops were found selling TBT paints, and when contacting São Vicente's main dockyard (Cabnave, Lta.), the information provided is that they no longer use OT-AFS. So, as far as we could perceive, no trade of TBT-paints exists in the island. We started to look for other potential sources of TBT pollution, and there is one that deserves credit and needs further investigation: sunk ships. In fact, there is an Ukrainian tugboat that was arrested since 2006 inside the bay and sunk in 2011 near Praia da Galé (Stn. 6), where the highest levels of imposex were observed. This ship may putatively carry OT-AFS. Finally, but not the least, sediments may constitute an important reservoir of organotins and represent a continuous source of these compounds to the overlaying water, as well documented for other geographical areas^{17,18}. The level of OT sediment contamination in Porto Grande Bay is not known, but TBT may be adsorbed to fine particles and organic matter of the sediments¹⁹ or associated with buried paint particles released by shipyards in the past, and remain in this compartment for decades.

This work provides a warning that TBT pollution is still a problem in Cabo Verde. Though we have focused our attention to *G. viverratus*, we also made some casual observations of imposex on other local gastropod species, which means that the impacts of this pollution are wider and worrying. Cabo Verde's future economic prospects should count on a healthy marine ecosystem to sustain fishery resources and tourism (in 2017 tourism represented 24% of the country's gross domestic product)²⁰, particularly the marine ecotourism that has been notably growing in this country, and so the control of marine pollution should be a priority by the government. Our results call for an urgent need of

performing a more comprehensive assessment of TBT pollution in the São Vicente to unveil the real sources of exposure to the biota, which includes the survey of the TBT content in the sediments and direct search for the presence of this compound in ships (either operational or sunk). So, although TBT pollution is now considered by many authors to be a tale of the past, the current work shows that in some geographical areas it still remains a concern and needs closer attention and immediate action.

2.5. References

1. Galante-Oliveira, S. *et al.* Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: Evaluation of legislation effectiveness. *J. Environ. Monit.* **11**, 1405–1411 (2009).
2. El Ayari, T. & El Menif, N. T. First Record of Imposex in *Euthria cornea* (Neogastropoda: Buccinidae) Collected from the Complex Lagoon-Channel of Bizerta. *Thalassas* **35**, 87–93 (2019).
3. El Ayari, T., Bierne, N. & El Menif, N. T. Imposex incidence in *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) from the Mediterranean and Atlantic coast after Tributyltin global ban. *J. Sea Res.* **134**, 10–15 (2018).
4. Galante-Oliveira, S. *et al.* *Nucella lapillus* L. imposex levels after legislation prohibiting TBT antifoulants: Temporal trends from 2003 to 2008 along the Portuguese coast. *J. Environ. Monit.* **13**, 304–312 (2011).
5. International Maritime Organization. *International Convention On the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships*. (2001).
6. Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Oliveira, I. B., Galante-Oliveira, S. & Barroso, C. Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast. *Environ. Pollut.* **232**, 411–421 (2018).
7. International Maritime Organization. Status of Conventions. (2019). Available at: <http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions/Pages/Default.aspx> .
8. Lopes-dos-Santos, R. M. A., Galante-Oliveira, S., Lopes, E., Almeida, C. & Barroso, C. Assessment of imposex and butyltin concentrations in *Gemophos viverratus*

- (Kiener, 1834), from São Vicente, Republic of Cabo Verde (Africa). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 10671–10677 (2014).
9. Benchimol, C., Francour, P. & M, L. The preservation of marine biodiversity in West Africa, the Case of Cape Verde Islands: proposal of a new biodiversity policy management. in *Ist Cape Verde Congress of Regional Development* 1–23 (2009).
 10. ENAPOR. Estatísticas Porto Grande. (2018). Available at: <http://www.enapor.cv/page/estatisticas-porto-grande>.
 11. Titley-O’Neal, C. P., Munkittrick, K. R. & MacDonald, B. A. The effects of organotin on female gastropods. *J. Environ. Monit.* **13**, 2360–2388 (2011).
 12. Lopes-Dos-Santos, R. M. A., Almeida, C., De Lourdes Pereira, M., Barroso, C. M. & Galante-Oliveira, S. Morphological expression and histological analysis of imposex in *Gemophos viverratus* (Kiener, 1834) (Gastropoda: Buccinidae): A new bioindicator of tributyltin pollution on the West African coast. *J. Molluscan Stud.* **80**, 412–419 (2014).
 13. Wilson, J. *et al.* Declines in TBT contamination in Irish coastal waters 1987-2011, using the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a biological indicator. *Mar. Pollut. Bull.* **100**, (2015).
 14. Kim, N. S., Hong, S. H., Shin, K.-H. & Shim, W. J. Imposex in *Reishia clavigera* as an Indicator to Assess Recovery of TBT Pollution After a Total Ban in South Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **73**, 301–309 (2017).
 15. Jones, M. R. L. & Ross, P. M. Recovery of the New Zealand muricid dogwhelk *Haustrum scobina* from TBT-induced imposex. *Mar. Pollut. Bull.* **126**, 396–401 (2018).
 16. Cacciatore, F. *et al.* Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the northern Adriatic Sea (Italy): Ecological risk assessment before and after the ban. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 688–698 (2018).
 17. Ruiz, J. M., Barreiro, R., Couceiro, L. & Quintela, M. Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. *Chemosphere* **73**, 1253–1257 (2008).
 18. Langston, W. J. & Pope, N. D. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **31**, 32–43 (1995).

19. Dowson, P. H., Bubb, J. M., Williams, T. P. & Lester, J. N. Degradation of Tributyltin in Freshwater and Estuarine Marina Sediments. *Water Sci. Technol.* **28**, 133–137 (1993).
20. Banco de Cabo Verde. *Relatório Anual*. (2017).

Capítulo 3 – Long-term monitoring of *Nucella lapillus* imposex in Ria de Aveiro (Portugal): when will a fully recovery happen?

Abstract

Nucella lapillus imposex has been monitored in Ria de Aveiro since 1997 in order to depict the temporal evolution of the TBT pollution in the region. Initially the levels of imposex in *N. lapillus* were high but they dropped rapidly after 2003 as a consequence of the implementation of the Regulation (EC) N° 782/2003. The OSPAR Ecological Quality Objective (EcoQO) (Vas Deferens Sequence Index, VDSI<2) was achieved since 2013, however a countercurrent tendency was registered in the most recent years (2018, 2019) with levels increasing since the last survey performed in 2013. In 2018 the VDSI values ranged between 0.6-1.0 across stations and the percentage of females affected with imposex (%I) varied from 63-100%; in 2019 the same parameters ranged between 0.4-1.0 and 37-100%. New TBT inputs may putatively be attributed to residual TBT existing in sediments and released through natural desorption or regular dredging operations, which requires further research. Despite the effectiveness of the legislation in reducing imposex, this work shows that a fully recovery of the populations seems to be difficult to achieve in a short or medium term, as low imposex levels may persist for many years. Unfortunately, we are learning that the TBT problematic is not a tale of the past, but rather a heritage for the future, and we may possibly have to wait decades before this tale is finally over.

Keywords: *Nucella lapillus*, TBT pollution, Imposex, Portugal

3.1. Introduction

The first Organotin-based Antifouling Systems (OT-AFS) appeared in the 1960s and soon became widely used throughout the world. Although tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) became notorious in the ship industry for being effective antifouling biocides, these compounds caused a series of adverse biological effects on a broad range of non-target aquatic organisms¹. For that reason, in 2008 the International Maritime Organization (IMO) implemented the International Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems on Ships (AFS Convention) prohibiting the use of OT-AFS on all kind of ships. The European Union anticipated the entry into force of the AFS Convention by applying the Regulation (EC) N° 782/2003, according to which OT-AFS could not be applied on ships after 1 January 2003 and ships should not bear such compounds after 1 January 2008². One of the most deleterious biological effects caused by TBT or TPT pollution is *imposex*, the superimposition of male sexual characters onto caenogastropod females³, which became a renowned biomarker of this type of pollution. The dog whelk *Nucella lapillus* has been widely used as an extremely sensitive indicator of TBT pollution in European coastal waters, with females developing imposex at concentrations as low as 1 ng/L and reaching sterility at 2.5-5 ng/L⁴. The dogwhelk is considered the key bioindicator of the OSPAR Coordinated Environmental Monitoring Program (CEMP) and an Ecological Quality Objective (EcoQO) was defined for the OSPAR region based on the vas deferens sequence index (VDSI) of this species ($VDSI < 2.0$)^{5,6}.

Ria de Aveiro (Portugal) is an estuarine system that has been subjected to regular organotin pollution monitoring since 1997^{4,7,8}. The imposex levels of *N. lapillus* have been assessed over these years, showing a sharp decline after 2003, coincident with the implementation of the Regulation (EC) N° 782/2003, and achieving the EcoQO since 2013⁸. Regardless of the optimistic results and the dubbing of the TBT/TPT as a tale of the past, it must be assured that imposex disappears completely and caenogastropod populations may fully recover from this pathological syndrome. Hence, the execution of periodic imposex biomonitoring surveys continues to be fundamental because this is the only possible way to understand how long the effects of TBT/TPT will endure in the marine ecosystems following the ban of OT-AFS. In this context, the aim of this study is to assess the levels of imposex in the dogwhelk at Ria de Aveiro in 2018 and 2019, in order to extend the chronological time series that has been constructed since 1997 so that

we can understand the temporal evolution of organotin pollution in the area and predict future trends.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Sampling and imposex analysis

Samples of *N. lapillus* were collected in September 2018 and 2019 at 8 sampling stations (stn.) in the region of Aveiro (Fig. 3.1): 3 were located inside the estuarine system – Marégrafo (stn. 1), Forte da Barra (stn. 2) and Magalhães Mira (stn. 3) – while the other 5 were situated in the adjacent ocean coast – Costa Nova (stn. 4), Vagueira (stn. 5), São Jacinto (stn. 6), Torreira (stn. 7) and Areão (stn. 8). Most of these sites are the same sampled in similar monitoring programs performed in the past (e.g., Laranjeiro et al. 2015⁸). The animals were collected by hand from the intertidal rocky shore and transported alive to the laboratory. Specimens were maintained under constant aeration in aquaria with artificial seawater for about 3 days and subsequently observed without narcotization. Shell height (from apex to the siphon canal) was measured with digital Vernier calipers to the nearest 0.1 mm and carefully cracked open with a bench vice. The dogwhelks were posteriorly sexed, females' mantle was cut, and genitalia exposed for imposex classification under a stereomicroscope. Male and female penis length was measured using a graduated eyepiece. The following imposex parameters were determined for each sampling station: the percentage of imposex-affected females (%I), the relative penis size index [$RPSI = \text{mean female penis length (FPL)}^3 \times 100 / \text{mean male penis length (MPL)}^3$], and the vas deferens sequence index (VDSI). The VDSI was classified according to the scoring system proposed by Gibbs et al. (1987)⁹.

Since this work aims to track the recent evolution of imposex in the Ria de Aveiro, the current results are statistically compared with the data obtained in the last monitoring campaign performed in 2013 at the same study area. For a clearer interpretation of imposex evolution trends, our data is also likened with the commercial ship traffic activity registered between 2012 and 2018 (Fig. 3.2) and compared with the dogwhelk VDSI levels registered since 1997 for a long-term trend analysis (Fig. 3.3). All the statistical procedures were executed through Prism v6.0 software.

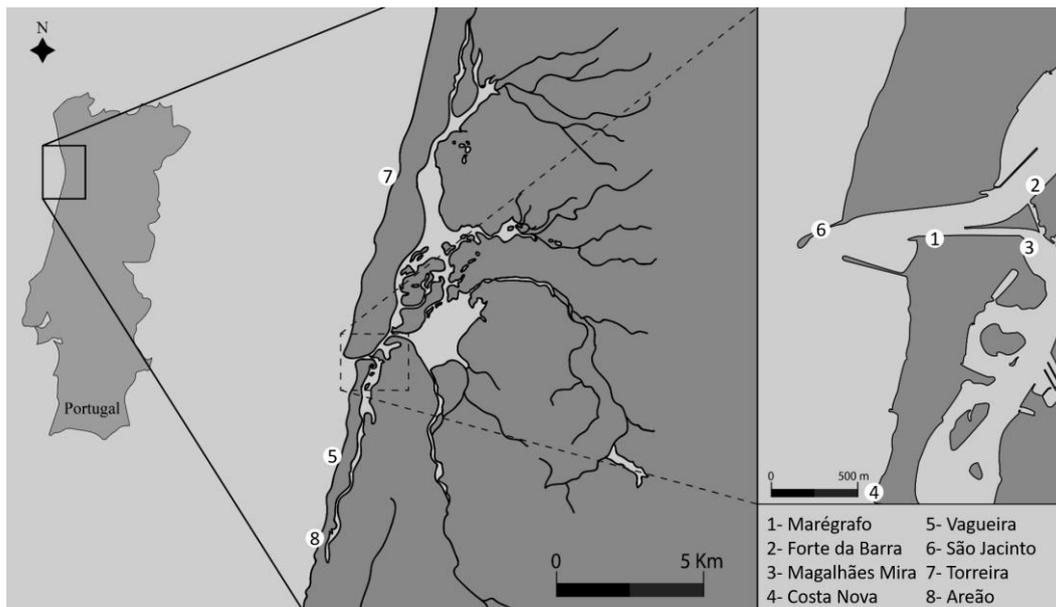


Figure 3.1 - Ria de Aveiro and adjacent coastal area map indicating the sampling stations location.

3.3. Results

The current study comprises 4 sampling stations that have been regularly surveyed since 1997, which provide a long-term perspective of the dogwhelk imposex evolution in the study area. Figure 3 shows the progress of the VDSI levels over the 22 years and denotes a drastic decline of imposex starting in 2003 (VDSI dropped rapidly from around 4 to about 1-2 in just four years), which stabilized at low levels (VDSI<1) from 2013 to 2019. We are particularly interested in studying the temporal evolution of imposex in this most recent period (2013-2019) to see if the populations can fully recover from this condition or if they maintain long-term residual levels. Hence, we compared imposex levels at 7 sampling stations that are common to the surveys performed in 2013 (reported by Laranjeiro et al. 2015)⁸, 2018 and 2019 (current work). These data are summarized in table 1 and show that samples collected in the three occasions always presented females affected by imposex, regardless the site of collection: %I varied between 35-100% in 2013, 63-100% in 2018 and 37-100% in 2019. As for 2018, there was one station reaching VDSI = 1.0 (Magalhães Mira - stn.3), whilst the others attained values between 0.63 and 0.83. In 2019 the highest levels were observed at stn.2 (Forte da Barra) and stn. 3 (Magalhães Mira) with a VDSI=1.0, whereas all the other sites showed VDSI levels between 0.37 and 0.94. The samples that exhibited the highest levels of imposex were

those obtained from inside the estuarine system where the major TBT pollution sources once prevailed. Among all females analysed in 2018 (n=204) and 2019 (n=236), none of them presented penis, and so RPSI was always zero. The Friedman's test showed no significant differences between 2013, 2018 and 2019 for VDSI and %I concerning all the 7 sampling stations grouped for each year (VDSI: Friedman statistic=3.6, p=0.185; %I: Friedman statistic=6.3, p=0.052). However, when analyzing each sampling site individually, we found differences in VDSI between 2013/2018/2019 at stn. 1 (Kruskal-Wallis statistic - K=8.24; p=0.016), stn. 2 (K=11.72; p=0.003), stn. 5 (K=8.06; p=0.018) and stn. 6 (K=23.75; p<0.0001), with post-hoc comparisons revealing an increasing trend with time (see Table 3.1).

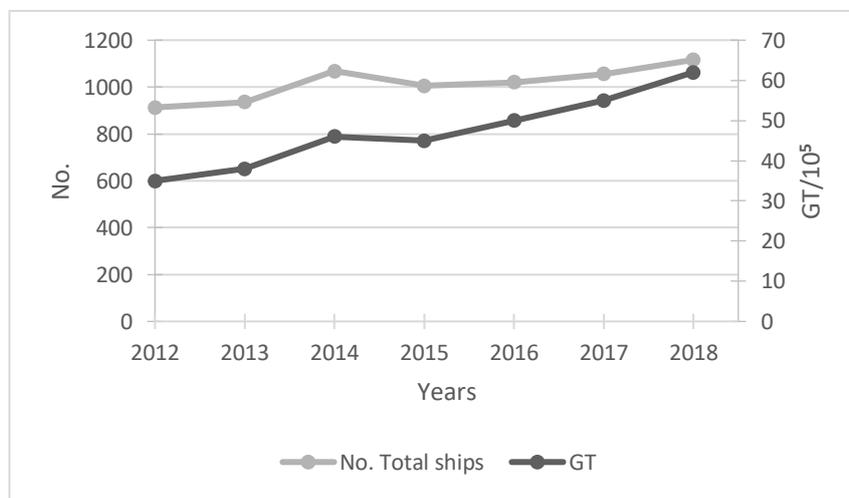


Figure 3.2 - Commercial ship traffic activity between 2012 and 2018 expressed in terms of total number (No.) and total gross tonnage (GT) of the ships entering the port of Aveiro. Data obtained from Porto de Aveiro website (<http://ww2.portodeaveiro.pt/>)

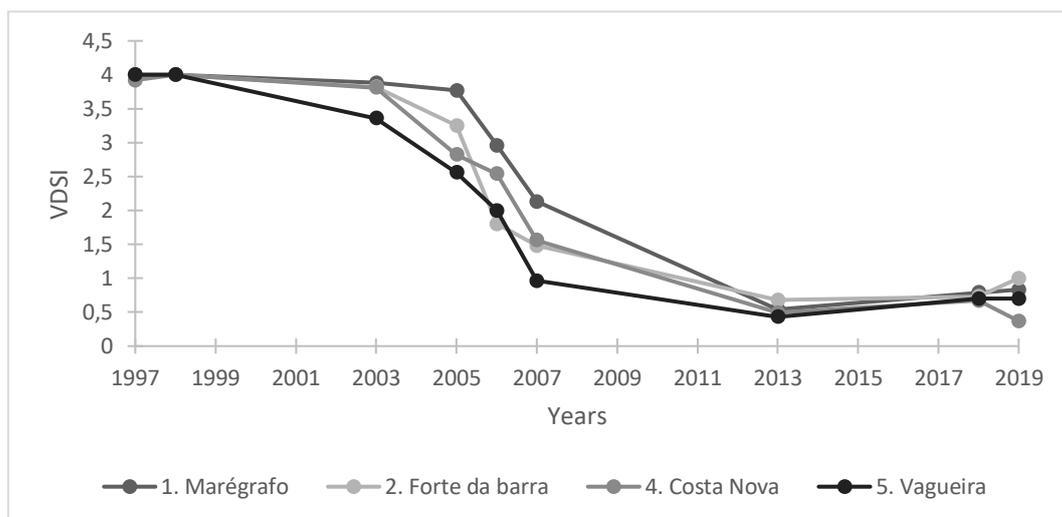


Figure 3.3 - VDSI levels in *Nucella lapillus* over the years for station 1 (Marégrafo), station 2 (Forte da Barra), station 4 (Costa Nova) and station 5 (Vagueira). Data on imposex levels between 1997 and 2007 were taken from Barroso et al. (2000)⁷ and Galante-Oliveira et al. (2009)⁴. Data from 2013 were taken from Laranjeiro et al. (2015)⁸.

Table 3.1 - *Nucella lapillus* imposex long-term monitoring. Number of analyzed specimens, male and female shell heights (mm), per site and year. Indication of the percentage of imposex-affected females (%I), relative penis size index (RPSI) and vas deferens sequence index (VDSI). Results on statistical comparisons between 2013 [data taken from Laranjeiro et al. (2015)⁸], 2018 and 2019 are given next to VDSI values: "a" designates a significant difference (p<0.05) comparing to 2013; "b" designates a significant difference (p<0.05) comparing to 2018. For additional data on site locations see Fig 1. Due to the lack of space, some years (2018 and 2019) are represented by two digits (18 and 19, respectively).

Stn. Code	Coordinates	N _M			N _F			SH _M			SH _F			%I			RPSI			VDSI		
		2013	18	19	2013	18	19	2013	18	19	2013	18	19	2013	18	19	2013	18	19	2013	2018	2019
1.	40°38'38.80"N 8°44'47.40"W	39	36	25	20	34	23	30.4	30.6	30.4	29.6	31.7	30.5	54	79	83	0.00	0.00	0.00	0.54±0.51	0.79±0.42	0.83±0.37 ^a
2.	40°38'52.90"N 8°44'2.80"W	28	30	36	17	30	32	27.3	29.9	28.9	27.9	30.7	29.8	68	73	100	0.00	0.00	0.00	0.68±0.48	0.73±0.44	1.00±0.00 ^{a,b}
3.	40°38'35.40"N 8°44'6.30"W	16	6	10	22	7	5	27.5	26.8	26.1	26.4	28.6	28.8	100	100	100	4.00	0.00	0.00	1.38±0.50	1.00±0.00	1.00±0.00
4.	40°36'31.00"N 8°45'26.40"W	39	26	37	21	34	47	23.4	22.6	22.4	22.3	22.7	22.1	49	67	37	0.22	0.00	0.00	0.49±0.51	0.67±0.47	0.37±0.49
5.	40°33'34.00"N 8°46'20.30"W	35	25	29	20	30	34	22.7	22.5	21.2	22.5	23.3	21.4	43	70	74	0.00	0.00	0.00	0.43±0.50	0.70±0.46	0.74±0.44 ^a
6.	40°38'41.30"N 8°45'37.20"W	37	25	23	21	30	32	23.3	21.8	22.3	22.7	22.3	22.9	35	63	94	0.00	0.00	0.00	0.35±0.48	0.63±0.48	0.94±0.29 ^{a,b}
7.	40°45'26.70"N 8°42'58.90"W	36	6	33	23	6	30	22.1	20.1	21.1	21.2	20.9	21.7	58	83	77	0.00	0.00	0.00	0.58±0.50	0.83±0.37	0.77±0.42
8.	40°31'7.10"N 8°47'2.00"W	n.a	21	33	n.a	33	33	n.a	20.1	21.5	n.a	20.9	22.4	n.a	70	79	n.a	0.00	0.00	n.a	0.70±0.46	0.79±0.41

3.4. Discussion

Imposex monitoring in Aveiro started in the decade of 1990's and still continues in order to depict the long-term pattern of the TBT pollution progress in the region. Initially the levels of imposex in *N. lapillus* were high but they dropped rapidly after the implementation of the Regulation (EC) N° 782/2003, a trend also reported throughout Europe and worldwide using *N. lapillus*^{10,11,12} or other caenogastropod species as bioindicators^{13,14,15}. In Aveiro, the OSPAR EcoQO (VDSI<2) was achieved in 2013, as reported by Laranjeiro et al. (2015)⁸. This condition is still observed nowadays because all dogwhelk samples showed a VDSI < 1 in the surveys performed in 2018 and 2019. However, we registered a significant increase of VDSI between 2013 and 2019 in 4 out of the 8 sampling sites, that is indicative that TBT pollution increased over this period of time. It is important to stress that during these years (2013-2018) there was a gradual growth of commercial ship traffic (Fig. 2) in the port of Aveiro, but it is unlikely that new TBT inputs may have come this source as OT-AFS were definitely abolished a dozen years ago. The most reliable source of TBT could in fact be the sediments - in 2005 the concentration of TBT in Ria de Aveiro sediments could reached 1780 ng Sn/g dry wt¹⁶. It is known that sediments constitute an important reservoir of TBT and may act as a long-term source of this pollutant to the overlaying water and biota, as it is well documented for other geographical areas^{16,17}. We believe that TBT compounds may have been released from the bottom of the Ria de Aveiro, not only due to natural desorption from sediments, but also due to regular dredging of the navigation channels that cross this estuarine system. Ria de Aveiro undergoes dredging operations annually as a way to ensure a good access to the Porto de Aveiro, with some locations enduring this activity 2 or 3 times on the same year. As more intense dredging operations happen, more inputs of TBT are likely to occur to the overlaying water, possibly leading to pluri-annual fluctuations of the imposex levels in this extremely sensitive species. Additionally, in 2019, the biggest dredging operation in Ria de Aveiro is being carried out throughout the 3 main channels, in a bid to improve navigation, protect agricultural fields and coastal erosion from the sea level rise. The intervention area is around 37000 ha, an extension of 95 Km, and the dredging volume may approach one million m³. The majority of the sediments (60-87%) from these operations will be used inside the estuarine system and the remainder (13-40%) will be deposited at sea.

In conclusion, despite the effectiveness of the legislation in reducing the levels of imposex in Ria de Aveiro, this work shows that a fully recovery of imposex seems to be difficult to achieve in a short or medium term. Unfortunately, we are learning that the TBT problematic is not a tale of the past, but rather a heritage for the future, and we may possibly have to wait decades before this tale is finally over.

3.5. Literature cited

1. Birchenough, A. C., Evans, S. M., Moss, C. & Welch, R. Re-colonisation and recovery of populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) on shores formerly subject to severe TBT contamination. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 652–659 (2002).
2. Commission, E. *Regulation (EC) No 782/2003 of the European Parliament and of the Council of 14 April 2003 on the prohibition of organotin compounds on ships. Official Journal* (European Union, 2003).
3. Smith, B. S. Sexuality in the american mud snail, *nassarius obsoletus* say. *J. Molluscan Stud.* **39**, 377–378 (1971).
4. Galante-Oliveira, S. *et al.* Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: Evaluation of legislation effectiveness. *J. Environ. Monit.* **11**, 1405–1411 (2009).
5. OSPAR. *JAMP Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effects.* (2008).
6. OSPAR. *Background Document on the Ecological Quality Objective on imposex in dog whelks Nucella lapillus.* (2005).
7. Barroso, C. M., Moreira, M. H. & Gibbs, P. E. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **201**, 221–232 (2000).
8. Laranjeiro, F., Sanchez-Marin, P., Galante-Oliveira, S. & Barroso, C. Tributyltin pollution biomonitoring under the Water Framework Directive: Proposal of a multi-species tool to assess the ecological quality status of EU water bodies. *Ecol. Indic.* **57**, 525–535 (2015).
9. Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Pascoe, P. L. & Burt, G. R. The use of the dogwhelk, *nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **67**, 507–523 (1987).

10. Wilson, J. *et al.* Declines in TBT contamination in Irish coastal waters 1987-2011, using the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a biological indicator. *Mar. Pollut. Bull.* **100**, (2015).
11. Schøyen, M. *et al.* Levels and trends of tributyltin (TBT) and imposex in dogwhelk (*Nucella lapillus*) along the Norwegian coastline from 1991 to 2017. *Marine Environmental Research* **144**, 1–8 (2019).
12. Nicolaus, E. E. M. & Barry, J. Imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*): 22-year monitoring around England and Wales. *Environ. Monit. Assess.* **187**, 1–14 (2015).
13. Cacciatore, F. *et al.* Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the northern Adriatic Sea (Italy): Ecological risk assessment before and after the ban. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 688–698 (2018).
14. Jones, M. R. L. & Ross, P. M. Recovery of the New Zealand muricid dogwhelk *Haustrum scobina* from TBT-induced imposex. *Mar. Pollut. Bull.* **126**, 396–401 (2018).
15. Kim, N. S., Hong, S. H., Shin, K.-H. & Shim, W. J. Imposex in *Reishia clavigera* as an Indicator to Assess Recovery of TBT Pollution After a Total Ban in South Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **73**, 301–309 (2017).
16. Sousa, A., Matsudaira, C., Takahashi, S., Tanabe, S. & Barroso, C. Integrative assessment of organotin contamination in a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal): Tracking temporal trends in order to evaluate the effectiveness of the EU ban. *Mar. Pollut. Bull.* **54**, 1645–1653 (2007).
17. Langston, W. J. & Pope, N. D. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **31**, 32–43 (1995).

Capítulo 4 – Considerações finais

4.1. Considerações finais

A problemática do TBT teve início na década de 1960's, sendo considerado por muitos autores como um dos compostos mais tóxicos introduzido de forma deliberada no ambiente marinho¹. As consequências nefastas provocadas por este composto nos organismos marinhos, com especial atenção para os moluscos, foram reconhecidas a partir do final da década de 60, originando ações legislativas em países seriamente afetados, seguindo-se uma ação da União Europeia e uma ação global pela IMO (convenção AFS) que culminou na proibição do uso das tintas a nível mundial em 2008². Os trabalhos de monitorização da poluição por TBT, realizados um pouco por todo o mundo, realçam a ocorrência de uma melhoria geral da população de gastrópodes, após a aplicação da convenção AFS e/ou de outras medidas similares que antecederam esta convenção^{4,5,6}. Todavia, apesar do progresso verificado, o estado atual da poluição por TBT suscita ainda muitas preocupações. Por um lado, ainda há países que não ratificaram a convenção AFS e não têm legislação própria que proíba o uso de AFS com TBT³, como é o caso de Cabo Verde (São Vicente), onde o nível de poluição se mantém elevado. Por outro lado, há países, como é o caso de Portugal, realçando a Ria de Aveiro, que apesar de ter ratificado a convenção, não verificou ainda uma completa eliminação da poluição, a qual parece ter estabilizado, em níveis muito baixos, por um longo período de tempo e sem “fim à vista”.

No caso da Ria de Aveiro, os resultados apresentados nesta dissertação (ver Capítulo 3) demonstram que apesar das diminuições significativas do níveis de *imposex* desde a implementação da Regulação (CE) N° 782/2003 que proíbe o uso de OT-AFS em 2003, ainda não foi atingida uma recuperação completa pelas populações; pelo contrário, observou-se um aumento significativo de VDSI em algumas estações em 2018 e 2019. Na ilha de São Vicente, Cabo Verde, os valores mantêm-se elevados, não tendo sido registada uma diminuição geral significativa desde 2012. As razões que conduziram a estas duas situações nas duas áreas sob estudo, São Vicente e Ria de Aveiro, são explicadas na discussão dos Capítulos 2 e 3, respetivamente. Neste capítulo, é elaborada uma análise sobre os impactos que os níveis de poluição têm em ambos os casos de estudo.

4.2. Tendências temporais da poluição por TBT na Ria de Aveiro

Os resultados obtidos durante a monitorização realizada ao longo da Ria de Aveiro e descrita nesta dissertação comprovam um decréscimo e estabilização dos níveis de *imposex* ao longo dos anos com valores de VDSI ≤ 1 . É importante realçar que estes valores não interferem, aparentemente, na abundância das populações, uma vez que não conduzem a uma esterilização das fêmeas e respeitam os objetivos de qualidade ecológica definidos (EcoQO) pela OSPAR de VDSI < 2 . Estes resultados vão de encontro a outros estudos de monitorização semelhantes, realizados recentemente em diversos países tais como Noruega⁷, Coreia do Sul⁸, Irlanda⁹, Itália⁶, Nova Zelândia⁶, Inglaterra e País de Gales¹⁰, onde se verificam diminuições significativas da poluição por TBT e níveis de *imposex* após a implementação de legislação. No entanto, os níveis de *imposex* ainda existentes nas populações costeiras, realçam a hipótese da existência de concentrações residuais presentes nos sedimentos.

Apesar dos níveis de VDSI encontrados não colocarem, aparentemente, em risco a população, as concentrações residuais continuam a ser absorvidas pelas populações de gastrópodes podendo provocar respostas que ainda são desconhecidas pois, o desenvolvimento de *imposex* é o resultado de variadas mudanças nos processos metabólicos induzidos pelos compostos de TBT. Os mecanismos que levam à indução deste fenómeno não estão clarificados ainda, existindo, no entanto, várias hipóteses em consideração. A hipótese mais aceite está relacionada com a ativação de recetores nucleares. Em 2014, Nishikawa et al. (2004)¹¹ demonstrou que o TBT se liga de forma eficiente ao recetor retinoide X (RXR) e que induz, por esta via, o *imposex* na espécie *Reishia clavigera*. Este mecanismo de ação foi também verificado em *Nucella lapillus*^{4,12}. Em 2009, le Maire et al. (2009)¹³ demonstrou que o TBT ativa o heterodímero RXR-PPAR γ , e posteriormente, foi descoberto que a rosiglitazona (um ligando para o recetor PPAR γ), induz *imposex* em *N. lapillus*¹⁴. Posto isto, parece evidente que a regulação sexual dos gastrópodes é influenciada pela interação dos compostos de organoestanho com recetores nucleares, embora os mecanismos em si não estejam ainda totalmente clarificados. Apesar dos avanços realizados nesta área, existe ainda uma grande falta de conhecimento acerca das vias de sinalização que dão origem ao *imposex* em gastrópodes (via neuro endócrina, esteróide e retinóide).

Como é evidente nos resultados, ainda que os valores encontrados se enquadrem nos limites impostos pela legislação, registou-se um aumento dos níveis de *imposex* em algumas estações. Isto indica que não é correto denominar o TBT como um “conto do passado” e que uma recuperação total das populações dificilmente será atingida num curto espaço de tempo.

4.3. Tendências temporais da poluição por TBT em Cabo Verde

No caso de Cabo Verde, até ao momento, não foram realizados estudos que definam objetivos de qualidade ecológica para *G. viverratus* e outras espécies de gastrópodes da região, que permitam estabelecer a correspondência de níveis de *imposex* como os existentes para *N. lapillus*. Ainda assim, os resultados obtidos corroboram os do estudo realizado em 2012, pois ao longo deste trabalho também se verificaram níveis elevados de poluição por TBT, com populações a atingir uma percentagem de *imposex* de 100% nos locais mais próximos à baía do Porto Grande, e, em alguns casos, provocando situações de esterilidade, colocando em risco as populações de *G. viverratus*. De facto, os valores de poluição elevados podem pôr em risco populações desta e outras espécies marinhas. Sendo Cabo Verde um arquipélago rico em biodiversidade e recursos marinhos uma importante fonte de rendimento para o país, a nível pesqueiro e turístico (como se explica a seguir), os desequilíbrios no ecossistema podem provocar impactos negativos para a economia da região.

4.3.1. Importância do turismo na República de Cabo Verde

O turismo em Cabo Verde tem crescido de uma forma gradual e constante (com algumas exceções), sendo que o número de hóspedes aumentou de 145.076 no ano de 2000 para 765.696 em 2018. A hotelaria registou um crescimento de 11,2% em 2017 face a 2016, e 8,3% em 2018 face ao ano anterior¹⁵. O turismo nas ilhas em desenvolvimento, e, especificamente em Cabo Verde, é de extrema importância, pois permite um aumento do crescimento económico-social do país, com relevância na formação do Produto Interno Bruto (PIB), atingindo uma contribuição de 23,6% em 2017¹⁶. Com este crescimento turístico, Cabo Verde tem melhorado o índice de *Travel & Tourism Competitiveness*, com

uma pontuação de 3,6 numa escala de 1 a 7, encontrando-se na posição 88º do ranking (num total de 140) e em primeiro lugar dos países da África Ocidental do índice global. No entanto, a pior classificação do país é registada nos recursos culturais (128º) e naturais (136º)¹⁷. O índice de recursos naturais refere-se ao “*número de locais naturais classificados como Património da Humanidade da UNESCO, medição da qualidade do ambiente natural que exiba a beleza das suas paisagens, riqueza da fauna do país e a percentagem de áreas protegidas nacionais*”¹⁷. Relativamente aos recursos culturais, “*são incluídos o número de locais culturais classificados como Patrimónios da Humanidade da UNESCO, número de estádios que possam albergar eventos de desporto e entretenimento e o número de pesquisas online relacionadas com os recursos culturais do país que permite inferir sobre o nível de interesse*”¹⁷. Ambos os índices têm elevada notoriedade para Cabo Verde, pois muito do seu turismo está, essencialmente, relacionado com a parte natural e cultural do país, sendo de grande relevância solucionar problemas que possam prejudicar algum desses índices, em virtude dos elevados níveis de poluição de forma a desenvolver ferramentas de melhoria.

4.3.2. Importância da pesca na República de Cabo Verde

Apesar da grande dimensão da ZEE de Cabo Verde e da elevada biodiversidade de espécies marinhas, o potencial haliêutico do país é reduzido. O baixo potencial pode ser atribuído à pequena extensão da plataforma continental, da natureza vulcânica das ilhas, ausência de fenómenos de *upwelling*, regime oceanográfico e hidrológico e, a ausência de cursos de água e pluviosidade. Tendo em conta a situação mencionada, os recursos pesqueiros têm uma contribuição de apenas 2% para o PIB do país¹⁸. Contudo, é uma atividade económica importante, pois é um meio de subsistência para a população local, constituindo uma oportunidade de emprego e de rendimento para a população¹⁹. Por essa razão, as comunidades locais são altamente dependentes dos seus recursos marinhos, sendo uma forma de subsistência de várias famílias. Visto que a abundância de espécies é reduzida, as populações marinhas da região são mais sensíveis à pesca desregulada e poluição, elevando a importância do uso sustentável dos recursos marinhos no país.

Os principais recursos do país estão representados pelos peixes pelágicos (ex.: atuns, serra, chicharro, cavala), demersais (garoupa, sargo), crustáceos (lagostas) e

moluscos (búzio-cabra). Existe um comércio valioso para os búzios, com especial atenção na espécie *Persististrombus latus* (búzio-cabra). *P. latus* é uma espécie comercializada com elevado valor económico, pois é cada vez mais requisitada para o uso turístico em bijuteria, souvenirs e como iguaria gastronómica. Sendo uma espécie de excessivo valor comercial, podendo atingir um valor médio anual de 7,5 €/Kg. Em 2001, a captura de búzio-cabra passou a fazer parte das três principais espécies capturadas no desembarque da pesca artesanal do mergulho com garrafa de ar comprimido: búzio-cabra (36,8%), budiões (22,3%) e lagostas costeiras (17,9%). Em 2005 os preços oscilaram entre os 500\$00-800\$00 ECV/Kg na ilha de S. Vicente.

A pesca destes animais pode ser realizada através de três métodos: utilização de draga, mergulho em apneia e mergulho com garrafa de ar comprimido. Este último método surgiu mais recentemente e foi adotado como uma alternativa mais rentável, com menor exigência física e permitindo uma pesca mais seletiva. Apesar da informação de pesca da população de *P. latus* ainda ser escassa, de acordo com dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Desenvolvimento das Pescas (INDP), comprova-se que ao longo dos anos tem existido uma tendência para a diminuição da população desta espécie. Esta espécie podia ser encontrada entre os 5 e 10 metros de profundidade, no entanto, nos últimos anos, os pescadores podem ter de atingir profundidades até os 20 ou 30 metros²⁰. Verifica-se também uma redução do tamanho médio de indivíduos, indicando incapacidade de renovação da população. As práticas que recorrem ao uso da draga e mergulho com garrafa foram, então, proibidas pela Resolução nº 29/2016 (Plano Executivo Bianual de gestão dos Recursos da Pesca). Esta resolução foi importante para garantir uma gestão adequada dos recursos pesqueiros e do licenciamento das atividades de pesca²¹. Como tal, apenas é autorizada a pesca através da apneia, permitindo limitar a exploração deste recurso. Apesar da implementação da Resolução nº 29/2016, a elevada demanda a nível nacional estimula o uso ilegal de métodos de pesca (garrafa de ar comprimido) e a difícil fiscalização por parte das autoridades competentes, o que contribui para uma contínua sobre exploração deste recurso²².

É importante destacar que estudos realizados para espécies da família Strombidae, *Lobatus gigas*²³ e *Laevistrombus canarium*²⁴, propõem estas como bioindicadoras para monitorização da poluição por TBT. Para o *P. latus* também já foi observado *imposex* na ilha de São Vicente (Barroso, observação pessoal). É possível inferir, tendo em conta os elevados níveis de TBT encontrados na ilha de São Vicente (através da monitorização de

G. viverratus), que diferentes espécies de gastrópodes são afetadas pelos níveis de poluição atuais. Os efeitos da poluição por TBT na subclasse caenogastropoda coloca em causa as diferentes populações e, atendendo à sua importância ecológica e económica, à sobre-exploração e poluição a que está sujeita, é imperativo reconhecer a importância da proibição do uso de tintas com TBT.

De acordo com a minha experiência pessoal, através do estágio curricular de seis meses na empresa de mergulho DiveTribe, a República de Cabo Verde é solicitado, principalmente, pelas suas paisagens naturais e biodiversidade marinha. Por essas razões, é de extrema importância que o turismo seja feito de uma forma sustentável, pois a ilha de São Vicente tem um elevado potencial de desenvolvimento de ecoturismo. Cada vez mais turistas, conscientes da importância da preservação do ambiente, pretendem um tipo de turismo que lhes permita ter acesso a locais com grande diversidade de ecossistemas, mas que, ao mesmo tempo, tenha um reduzido impacto ambiental. Também as comunidades locais são informadas e entendem que podem beneficiar deste tipo de consciencialização²⁵. Os turistas que praticam e querem experimentar o mergulho ou *snorkel* demonstram fascínio pela vida marinha e interesse na identificação da fauna e flora observada ao longo dos diferentes trilhos subaquáticos. Posto isto, facilmente se percebe a importância tanto da preservação da biodiversidade marinha, como da continuada sensibilização por parte dos turistas para a mesma. Também os mergulhadores mais experientes se deslumbram com a biodiversidade das águas Cabo-Verdianas e com a observação de espécies raras. Há um grande número de mergulhadores que regressa a São Vicente pela vida marinha, mas também pela beleza natural das paisagens, pela vida cultural da cidade de Mindelo e, não menos importante, pela população local que, como pude comprovar pessoalmente, enaltece a experiência de vida na ilha.

Em conclusão, os resultados obtidos do estudo realizado na ilha de São Vicente contribuem para confirmar que os níveis de poluição continuam elevados. É de extrema importância perceber qual a fonte de poluição por TBT na ilha, dada a relevância que os recursos marinhos têm para o país. Estes resultados podem contribuir para a implementação de políticas reguladoras relativamente ao uso de OT-AFS, preservando, desta forma, os recursos naturais aí existentes. O estudo realizado na Ria de Aveiro permitiu verificar que as concentrações residuais de TBT presentes nos sedimentos não permitirão uma recuperação total das populações de gastrópodes num curto/médio prazo,

elevando a importância da realização de monitorizações periódicas, de forma a controlar a persistência da poluição por TBT nesta área.

4.4. Sugestões para investigações futuras

Como perspectiva futura, seria importante, como continuação de ambos os estudos, examinar os tecidos dos animais e os sedimentos, analisando a concentração de TBT, DBT e MBT para verificar a correlação com os resultados de *imposex* registados. Para a Ilha de São Vicente, seria importante estudar de forma aprofundada as possíveis fontes de poluição por TBT através de análises ao sedimento e a navios (afundados ou operacionais). Além disso, seria relevante alargar o número de espécies de gastrópodes para a avaliação de *imposex* (ex.: *Persitistrombus latus*, *Stramonita haemastoma*) e desenvolver objetivos de qualidade ecológica com base neste biomarcador, pois existe, ainda, uma grande lacuna de informação relativamente a este assunto na República de Cabo Verde. Para a Ria de Aveiro, seria importante continuar a monitorização por mais anos para avaliar a tendência de evolução temporal a longo prazo.

4.4. Referência bibliográficas

1. Goldberg, E. D. Tbt: An environmental dilemma. *Environment* **28**, 17–44 (1986).
2. IMO. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. *International Maritime Organization* (2008).
3. International Maritime Organization. Status of Conventions. (2019). Available at: <http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions/Pages/Default.aspx>.
4. Sousa, A., Barroso, C., Tanabe, S. & Horiguchi, T. Involvement of Retinoid X Receptor in Imposex Development in *Nucella lapillus* and *Nassarius reticulatus*—Preliminary Results. *Interdiscip. Stud. Environ. Chem. Responses to Contam.* **3**, 189–196 (2010).
5. Cacciatore, F. *et al.* Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in Hexaplex

- trunculus (Linnaeus, 1758) from the northern Adriatic Sea (Italy): Ecological risk assessment before and after the ban. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 688–698 (2018).
6. Jones, M. R. L. & Ross, P. M. Recovery of the New Zealand muricid dogwhelk *Haustrum scobina* from TBT-induced imposex. *Mar. Pollut. Bull.* **126**, 396–401 (2018).
 7. Schøyen, M. *et al.* Levels and trends of tributyltin (TBT) and imposex in dogwhelk (*Nucella lapillus*) along the Norwegian coastline from 1991 to 2017. *Marine Environmental Research* **144**, 1–8 (2019).
 8. Kim, N. S., Hong, S. H., Shin, K.-H. & Shim, W. J. Imposex in *Reishia clavigera* as an Indicator to Assess Recovery of TBT Pollution After a Total Ban in South Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **73**, 301–309 (2017).
 9. Wilson, J. *et al.* Declines in TBT contamination in Irish coastal waters 1987–2011, using the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a biological indicator. *Mar. Pollut. Bull.* **100**, 289–286 (2015).
 10. Nicolaus, E. E. M. & Barry, J. Imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*): 22-year monitoring around England and Wales. *Environ. Monit. Assess.* **187**, 736 (2015).
 11. Nishikawa, J. I. *et al.* Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 6271–6276 (2004).
 12. Castro, L. F. C. *et al.* Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquat. Toxicol.* **85**, 57–66 (2007).
 13. le Maire, A. *et al.* Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Rep.* **10**, 367–373 (2009).
 14. Pascoal, S. *et al.* Transcriptomics and in vivo tests reveal novel mechanisms underlying endocrine disruption in an ecological sentinel, *Nucella lapillus*. *Mol. Ecol.* **22**, 1589–1608 (2013).
 15. Instituto Nacional de Estatística Cabo Verde. *Estatísticas do Turismo* -

- Movimentação de hóspedes.* (2018).
16. Banco de Cabo Verde. *Relatório Anual.* (2017).
 17. World Economic Forum. *The Travel and Tourism Competitiveness Report 2019: Travel and Tourism at a Tipping Point.* (2019).
 18. Africa infomarket. *O sector das pescas em Cabo Verde.* (2005).
 19. Instituto Nacional de Estatística Cabo Verde. *Anuário estatístico.* (2017).
 20. Instituto Nacional de Desenvolvimento das Pescas & Fundação Maio Biodiversidade. *Análise e Interpretação de Dados de Búzia-Cabra (Persististrombus latus) na Ilha do Maio.* (2017).
 21. Boletim Oficial da República de Cabo Verde. *Resolução nº8/2018, 1 de fevereiro.* 75 (2018).
 22. Merino, S., Mendes, R., Monteiro, I. & Almeida, A. *Contribuições para o estudo da pescaria do Búzio Cabra e sua Gestão Sustentável do Strombus Latus, (Gmellin, 1791) em Cabo Verde.* (2006).
 23. Titley-O’Neal, C. P., MacDonald, B. A., Pelletier, É., Saint-Louis, R. & Phillip, O. S. The relationship between imposex and tributyltin (TBT) concentration in *Strombus gigas* from the British Virgin Islands. *Bull. Mar. Sci.* **87**, 421–435 (2011).
 24. Cob, Z. C., Arshad, A., Bujang, J. S. & Abd. Ghaffar, M. Description and evaluation of imposex in *Strombus canarium* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Strombidae): A potential bio-indicator of tributyltin pollution. *Environ. Monit. Assess.* **178**, 393–400 (2011).
 25. Davenport, J. & Davenport, J. L. The impact of tourism and personal leisure transport on coastal environments: A review. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **67**, 280–292 (2006).