

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

Master en Eval. Amb. Ecosistemas marinos y Cost.

---



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



ESCUELA POLITECNICA  
SUPERIOR DE GANDIA

# “Niveles de metales en mejillones procedentes de instalaciones portuarias”

**TRABAJO FINAL DE MASTER**

Autor/a:

**Luis Manuel Atoche Ordoñez**

Tutor/a:

**Silvia Laura Falco Giaccaglia  
Sagrario Torres Cartas**

**GANDIA, 2017**

## INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.1. Uso del TBT como pintura antifouling.....</b>                 | <b>4</b>  |
| <b>1.2. Biocidas en los actuales revestimientos antifouling.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1.3. Bioindicadores.....</b>                                       | <b>7</b>  |
| <b>1.3.1. Mejillones. ....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1.4. Acumulación de metales en puertos. ....</b>                   | <b>9</b>  |
| <b>1.5. Contaminación marina en el Mediterráneo. ....</b>             | <b>10</b> |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>2.1. Objetivos específicos: ....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                   | <b>13</b> |
| <b>3.1. Zona de estudio. ....</b>                                     | <b>13</b> |
| <b>3.2. Puntos de muestreo. ....</b>                                  | <b>13</b> |
| <b>3.3. Muestreo.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3.4. Método de limpieza.....</b>                                   | <b>17</b> |
| <b>3.5. Procesamiento de los organismos.....</b>                      | <b>18</b> |
| <b>3.6. Método de análisis.....</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>3.7. Control de calidad del método.....</b>                        | <b>24</b> |
| <b>3.8. Tratamiento estadístico de los datos experimentales. ....</b> | <b>25</b> |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                 | <b>26</b> |
| <b>4.1 Talla de mejillones.....</b>                                   | <b>26</b> |
| <b>4.2. Concentraciones de cobre.....</b>                             | <b>28</b> |
| <b>4.3. Concentraciones de zinc.....</b>                              | <b>31</b> |
| <b>4.4. Análisis Multivariado – Componentes principales.....</b>      | <b>34</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>7. ANEXOS.....</b>   | <b>47</b> |

## Resumen

En este estudio se evalúa los niveles de metales procedentes de instalaciones portuarias, donde utilizamos al mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) como bioindicador debido a su capacidad filtradora ya que acumulan metales en sus tejidos y nos proporcionan una imagen integrada del tiempo de contaminación ambiental en zonas portuarias. Se muestrearon seis puertos deportivos, un puerto comercial y dos zonas control. Se determinó la concentración de cobre y zinc en las partes blandas de los mejillones mediante espectrofotometría de absorción atómica. La concentración de zinc fue mayor que la de cobre tanto de los organismos de los puertos como de las zonas control, debido a que el zinc tiene mayor tasa de asimilación en los bivalvos que el cobre. Por otra parte los niveles de cobre fueron mayores en los mejillones procedentes de puertos que de las zonas control debido al elevado número de embarcaciones que utilizan pinturas antiincrustantes basadas en cobre que se encuentran confinadas en un espacio pequeño.

**Palabras claves:** mejillones, *Mytilus galloprovincialis*, metales pesados, puertos, cobre, zinc.

## Abstract

The levels of metals from harbors are evaluated in this study. Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) has been used as a bioindicator due to its filtering capacity. They are able to accumulate metals in their tissues and provide us with an integrated image of environmental contamination in port areas. Six marinas were sampled, one commercial port and two control zones were sampled. The concentration of copper and zinc in soft parts of mussels was determined by absorption atomic spectroscopy. The concentration of zinc was higher than the concentration of copper in organisms from both harbours and control zones, because of its higher assimilation rate in bivalves. Copper levels were higher in marinas than in fishing ports and control areas due the high number of boats with copper-based antifouling paints that are confined in a small area.

**Key words:** mussels, *Mytilus galloprovincialis*, heavy metals, ports, copper, zinc.

## **Agradecimientos:**

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han brindado su ayuda para culminar este trabajo. En primer lugar a Dios por todo lo que me brinda día a día. A Silvia y Sagrario que como tutoras han sido muy paciente en guiarme y trasmitirme sus conocimientos para mejora de este trabajo. A Miguel, Blanca, Jimena y Marlon por su ayuda en los muestreos. A Pronabec por brindarme la beca para mis estudios del máster. A mi madre, hermanos y cada uno de mis familiares por creer en mí.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Uso del TBT como pintura antifouling.**

La incrustación biológica (fouling) describe la comunidad de organismos que se asientan y crecen en las superficies externas de objetos sumergidos o semi sumergidos, tanto naturales como artificiales (Lewis, 1998). A las pocas horas de la sumersión de una estructura, en el mar se desarrolla una capa, la cual está compuesta por organismos microscópicos (bacterias y algas) unidos dentro de una matriz extracelular de sustancias poliméricas (Steinberg, De Nys, & Kjelleberg, 2002). Esta capa facilita la fijación y la unión de microorganismos, plantas y animales, proporcionando señales bioquímicas para la fijación y aumentando su adherencia al sustrato. Se trata de un fenómeno natural que ocurre de manera continua y vigorosa en superficies sumergidas; este proceso se llama biofouling (Löschau & Krätke, 2005).

Cuando este fenómeno ocurre en el casco de un buque, ocasiona una serie de inconvenientes debido a que, al aumentar la fricción, se reduce la velocidad de la nave, o se requiere un aumento de la potencia y del consumo de combustible para mantener la velocidad (Abbott, Abel, Arnold, & Milne, 2000). Esto no sólo conduce a un mayor consumo de combustible, sino también a mayores costos para el mantenimiento del casco. Por ejemplo, se ha estimado que el efecto de no tener una protección anti-incrustante adecuada da como resultado un aumento de hasta un 40% en el consumo de combustible (Champ, 2000). La bioincrustación también puede conducir a la biocorrosión, cuando se acelera el efecto corrosivo del agua de mar en el metal, reduciendo la vida útil de las estructuras técnicas en el medio marino (Löschau & Krätke, 2005).

Se han desarrollado tecnologías antifouling que incluyen el uso de biocidas (por ejemplo, cobre y tributilestaño) para prevenir el asentamiento de organismos en los buques, pero su uso generalizado ha introducido altos niveles de contaminación en el medio ambiente y ha suscitado preocupación por sus efectos tóxicos en las comunidades marinas (Dafforn, Lewis, & Johnston, 2011).

Desde el descubrimiento de los compuestos organoestánicos, en particular el tributilestano (TBT) en los años 60, se aplicó ampliamente como antifouling y pronto se encontró que se bioacumulaba en organismos marinos. La transmisión a través de la red alimentaria (es decir, la biomagnificación) se hizo evidente en los años setenta cuando se detectaron concentraciones elevadas de TBT en micro y macroalgas, moluscos, también en peces, aves y mamíferos, en particular, en puertos y marinas (Carić, Klobučar, & Štambuk, 2016). Se detectaron por ejemplo, niveles altos de TBT en sedimentos y organismos vivos cerca de los principales puertos comerciales portugueses (Quevauviller, Lavigne, Pinel, & Astruc, 1989).

Así, bajo la influencia del TBT liberado de las pinturas antifouling que contienen biocidas, se producen anomalías reproductivas durante el desarrollo del sistema reproductor femenino de los moluscos (Prime, Peharda, Jelić, Mladineo, & Richardson, 2006; Thomas, Raymond, Chadwick, & Waldock, 1999). Esto resulta en la aparición de imposex, es decir, diferentes grados de superposición de los órganos sexuales masculinos (pene y conducto deferente) en las hembras (Garaventa et al., 2006).

En general, la masculinización femenina ocurre junto con la pérdida de funcionalidad reproductiva dentro de las poblaciones afectadas. Por lo tanto, el impacto xenoandrógeno detectado en las poblaciones costeras de moluscos proporciona evidencia de contaminación acumulada a largo plazo de TBT en estos ecosistemas (Carić et al., 2016).

Las preocupaciones ambientales sobre el impacto potencial de las pinturas a base de TBT utilizadas en el pasado han llevado a medidas reguladoras alrededor del mundo para prohibir el uso de estos antifouling y la Organización Marítima Internacional (OMI) adoptó la Convención Internacional sobre el Control de Sistemas Antifouling Nocivos sobre Buques en octubre de 2001 (Löschau & Krätke, 2005). En la UE los compuestos orgánicos de estaño en los buques están regulados desde julio de 2003 Reg 782/2003 / CE en última instancia, la producción de TBT fue prohibida en todo el mundo en el 2008 (Gipperth, 2009).

Hoy en día el TBT está considerado entre los compuestos más peligrosos que han sido deliberadamente liberados al medio marino. Debido a los efectos

adversos sobre el medio ambiente marino, en 1989 se prohibieron los revestimientos en la Unión Europea para uso en embarcaciones de recreo (<25 m de longitud), y desde 2008 existe una prohibición mundial para todos los buques a través de la Convención Internacional sobre el control de los sistemas antifouling nocivos en los buques, adoptado por la Organización Marítima Internacional (Ytreberg, Bighiu, Lundgren, & Eklund, 2016).

El TBT es uno de los compuestos androgénicos más potentes jamás añadidos al medio ambiente. Varios años después de la regulación, los compuestos orgánicos de estaño todavía se detectan en organismos marinos en todo el mundo, y el fenómeno de imposición en los gasterópodos es ampliamente reportado (Cajaraville et al., 2000).

Dado que la degradación del TBT en los sedimentos ha mostrado ser lenta, con vidas medias que varían de años a decenios, los puertos pesqueros y deportivos de todo el mundo aún mantienen concentraciones elevadas en sedimentos en comparación con los ambientes marinos no contaminados (Carić et al., 2016; Ytreberg et al., 2016).

Así por ejemplo se detectaron compuestos bioacumulados de compuestos orgánicos de estaño en agua de mar y mejillones recogidos en el 2009 y 2010 con concentraciones elevadas de TBT, donde los resultados indican que la mayor entrada de TBT se encuentran en los puertos deportivos (Furdek et al., 2012).

La prohibición de las sustancias nocivas en las pinturas antifouling requiere el desarrollo de nuevas estrategias antifouling con normas aceptables para las condiciones de uso y efectos adversos despreciables durante el uso en el trabajo, tanto para los consumidores como para el medio ambiente acuático (Löschau & Krätke, 2005).

## **1.2. Biocidas en los actuales revestimientos antifouling.**

En la actualidad se utilizan biocidas en los revestimientos antifouling de las embarcaciones para evitar la unión de una amplia variedad de organismos marinos unicelulares y multicelulares en su superficie. Estos revestimientos se

disuelven en el agua del mar, emitiendo en el ambiente circundante sus ingredientes activos, que son tóxicos para los organismos marinos y perjudican la función de diferentes vías cruciales para su fotosíntesis, reproducción y crecimiento (Carić et al., 2016).

El principal componente biocida en la mayoría de los recubrimientos antifouling utilizados hoy en día es el cobre (Cu), a veces se emplean también compuestos de zinc (Zn) o reforzantes orgánicos, así como combinaciones de diferentes biocidas (Cao, Wang, Chen, & Chen, 2011; Guardiola, Cuesta, Meseguer, & Esteban, 2012; Jones & Bolam, 2007; Srinivasan & Swain, 2007). El cobre se utiliza en los recubrimientos antifouling como cobre metal, óxidos, tiocianatos o sulfuros. Los compuestos comúnmente utilizados son el óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), es un pigmento de color rojo, aunque se pueden obtener otros colores a partir de tiosinato cuproso  $\text{CuSCN}$  (blanco) o el sulfuro cuproso  $\text{Cu}_2\text{S}$  – o el óxido de cobre (II)  $\text{CuO}$  (negro) (Vetere, Pérez, Romagnoli, Stupak, & Amo, 1997).

El cobre, en comparación con el TBT, resulta menos tóxico. Sin embargo, sigue siendo tóxico para los organismos marinos no objetivo, inhibiendo la fotosíntesis y las enzimas del ciclo de Krebs, induciendo estrés oxidativo y mutaciones y alterando las capacidades reproductivas (Fitridge, Dempster, Guenther, & de Nys, 2012).

La mayor fuente de cobre y zinc son las embarcaciones que emplea pinturas antifouling a base de cobre y ánodos de sacrificio basados en zinc (Matthiessen, Reed, & Johnson, 1999). Esto indica que la contaminación de cobre en sitios de turismo náutico puede causar un incremento de hasta mil veces la concentración ambiental de este metal en ambientes marinos no contaminados (Carić et al., 2016). De hecho Canadá y Dinamarca ya plantearon alguna restricción en la aplicación de los antifouling basados en el cobre en relación con la tasa de liberación de Cu a partir de estos compuestos (Dafforn et al., 2011).

### **1.3. Bioindicadores.**

Son organismos que proporcionan información sobre la calidad ambiental a través de reacciones identificables (bioquímicas, fisiológicas, morfológicas o cronológicas).



Los bivalvos son los seres vivos más utilizados como indicadores de metales pesados ya que concentran contaminantes en sus tejidos y pueden proporcionar una imagen integrada en el tiempo de la contaminación local (Martínez Guijarro, Romero, & Pachés, 2015); de hecho pueden acumular metales traza, hidrocarburos aromáticos policíclicos, hidrocarburos alifáticos, compuestos orgánicos halogenados, pesticidas orgánicos fosfatados, etc (Baumard, Budzinski, & Garrigues, 1998; Bresler & Fishelson, 1994; Martínez Guijarro et al., 2015). Así mismo es la célula el sitio donde se produce la acumulación de contaminantes, el metabolismo y la toxicidad; ciertas respuestas celulares se han utilizado como biomarcadores de exposición a contaminantes y efectos en programas de monitoreo ambiental (Cajaraville et al., 2000; Moore, 1985).

### **1.3.1. Mejillones.**

Debido a sus características biológicas y ecológicas, los mejillones (*Mytilus* spp) se han utilizado comúnmente en más de 50 países como bio indicadores, proporcionando una imagen integrada en el tiempo de la contaminación local (Cantillo, 1998).

Los mejillones del género *Mytilus* se encuentran entre los organismos centinela más utilizados para la vigilancia ambiental y pueden proporcionar una medida de la contaminación ambiental con respuestas celulares y fisiológicas observables. Los mejillones son invertebrados filtradores inter mareales conocidos por acumular altos niveles de metales traza y compuestos orgánicos en sus tejidos (Lau & Wong, 2003). Así mismo, tiene una serie de propiedades que los hacen útiles centinelas de la contaminación marina, ya que tienen una amplia distribución geográfica, son fáciles de recoger y se someten a altos niveles de contaminación (Manduzio, Monsinjon, Galap, Leboulenger, & Rocher, 2004; Martínez Guijarro et al., 2015; Zorita et al., 2007).

La mayor cantidad de acumulación de metales pesados se da en los lisosomas de las células digestivas de los mejillones que son organelos del citoplasma que contienen hidrolasas ácidas capaces de degradar la mayoría de las macromoléculas celulares a productos de bajo peso molecular (Bocchetti et al., 2008; Sarasquete, Gonzales de Canales, & Gimeno, 1992). Por ello el agrandamiento de los lisosomas en las células digestivas de moluscos es

ampliamente aceptado como un marcador de estrés general, ya que es inducido en respuesta a una variedad de factores estresantes incluyendo contaminantes orgánicos y metálicos y cambios en varias variables ambientales naturales (temperatura, salinidad, disponibilidad de alimentos) o el ciclo reproductivo (Moore, 1993). Estos organelos están ampliamente desarrollados en tejidos digestivos y hemocitos y tienen un papel fundamental en la fisiología celular, la digestión de los alimentos, la rotación intracelular, la función inmunitaria, el secuestro y la excreción de compuestos dañinos (Moore, 1988).

#### **1.4. Acumulación de metales en puertos.**

Las áreas portuarias representan ambientes críticos con importancia económica estratégica. Sin embargo también plantean grandes preocupaciones debido a la presencia de productos químicos tóxicos y sus efectos perjudiciales sobre los ecosistemas marinos que están sometidos a diversas formas de perturbación relacionadas con actividades como el transporte, la construcción naval, la refinería de petróleo, el tratamiento de aguas urbanas, la producción de energía eléctrica, el dragado y el vertido de sedimentos. Estas actividades son las responsables de la existencia de concentraciones típicamente elevadas de contaminantes que se acumulan en los sedimentos debido a la limitada energía hidrodinámica en las porciones interiores de los puertos (Bocchetti et al., 2008). Todos estos impactos coexisten en los puertos más grandes, extendiendo a menudo su influencia a través de la difusión de metales pesados como cobre y zinc (Regoli et al., 2002). En estos ambientes, los organismos están expuestos a mezclas de contaminantes, cuyos efectos sinérgicos apenas se interpretan y predicen a partir de los análisis químicos. Algunos contaminantes se acumulan fuertemente en los tejidos sin inducir efectos tóxicos, mientras que otros se caracterizan por una elevada toxicidad a bajos niveles de exposición (Regoli et al., 2002, 2004).

En los puertos se pueden acumular metales pesados en las operaciones de dragado y después de estas actividades, la biodisponibilidad de estos productos químicos se mantiene elevada en todas las áreas de dragado debido a la resuspensión de los contaminantes, su biodisponibilidad y los riesgos toxicológicos (Bocchetti et al., 2008). La movilidad de los metales traza a partir

de los sedimentos de dragado se ha demostrado en el puerto de Barcelona, proporcionando evidencia específica para una remobilización significativa, especialmente de cadmio, zinc, plomo y cobre (Guevara-Riba, Sahuquillo, Rubio, & Rauret, 2004). De manera que se ha demostrado que los sedimentos en los puertos contienen valores crecientes de elementos presentes en pinturas antifouling (cobre, arsénico, zinc y plomo) (Obhodas, Valkovic, Davorin, Matika, & Pavic, 2009).

Por todo ello los biocidas se reconocen en la actualidad como una de las amenazas más perjudiciales para el medio marino (Obhodas et al., 2009). Además diversos estudios en mejillones, indican que los puertos son zonas más afectadas por la contaminación (Zorita et al., 2007).

### **1.5. Contaminación marina en el Mediterráneo.**

El Mar Mediterráneo es una cuenca semi cerrada que cubre un área de 2,5 millones de km<sup>2</sup> y contiene 3,7 millones de km<sup>3</sup> de agua. El tiempo de intercambio de agua es de unos 80 años y esta lenta tasa de rotación da lugar a un alto impacto antropogénico. A lo largo de la costa la urbanización ha crecido, para dar cabida a la población permanente y temporal (el Mediterráneo es el mayor destino turístico del mundo), provocando como consecuencia, una modificación sustancial de la costa y efectos adversos en la calidad del medio ambiente. Además, existe una amplia gama de actividades industriales muy extendidas a lo largo de toda la cuenca mediterránea, así como una serie de zonas altamente industrializadas que se concentran principalmente en la parte noroeste de la región. Todas estas actividades constituyen fuentes de contaminación a través de la eliminación directa, la escorrentía continental y el transporte atmosférico (Chemicals, 2002).

Los metales están entre los principales contaminantes que llegan al medio marino y sus niveles han aumentado en las últimas décadas como consecuencia de las actividades antropogénicas y del desarrollo tecnológico. Por una parte, la exposición de organismos marinos a ciertos metales puede conducir a alteraciones de varios procesos bioquímicos. Además, también provoca la

disminución de la calidad de agua y de los sedimentos, lo que conlleva una disminución de los recursos naturales (Cajaraville et al., 2000; Gray, 1992).

Además, la combinación del impacto humano y la amplia variabilidad de los factores ambientales naturales pueden provocar trastornos en la homeostasis de los ecosistemas, lo que da lugar a una disminución de la biodiversidad en el mediterráneo. Por otra parte el daño oxidativo ha sido causalmente ligado a varios tipos de estrés ambiental, tanto natural como artificial, cuyo resultado es el deterioro de las funciones celulares de los mejillones (Frenzilli, Nigro, Scarcelli, Gorbi, & Regoli, 2001).

Así mismo, el tráfico de barcos se considera una fuente antropogénica importante de Cu en el medio acuático costero (Warnken, Dunn, & Teasdale, 2004), reconocido como una amenaza para la salud ambiental de los ecosistemas marinos (Carić et al., 2016; Karlsson, Ytreberg, & Eklund, 2010).

Por lo tanto, es cada vez más relevante determinar el alcance de la contaminación antivegetativa y su impacto perjudicial en el ecosistema en cuestión a fin de establecer las medidas apropiadas de ordenación costera. Es necesario realizar estudios sobre este tema para aportar pruebas adicionales para reforzar la aplicación de la Directiva marco sobre la estrategia marina (MSFD) preparada por la Comisión de las Comunidades Europeas (CCE, 2008). MSFD es una Política Marítima Integrada de la Unión Europea con el objetivo de alcanzar el "Buen Estado Medioambiental" (GES) en aguas marinas europeas para 2020 (Carić et al., 2016).

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo general de este trabajo es estudiar el nivel de contaminación existente en mejillones procedente de instalaciones portuarias como consecuencia principalmente del uso de pinturas antifouling.

### **2.1. Objetivos específicos:**

- Determinar los niveles de metales, principalmente Cu y Zn, en organismos filtradores (mejillones *Mytilus galloprovincialis*), de distintas instalaciones portuarias.
- Analizar posibles relaciones entre los niveles de metales en mejillones y la densidad de embarcaciones de la instalación, volumen de agua confinado y tamaño de los mejillones.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Zona de estudio.**

La zona de estudio son los principales puertos pesqueros y deportivos de la Comunidad Valenciana, ubicados en el golfo de Valencia, de la costa mediterránea de la península ibérica, en las costas del este de España.



Figura 3.1. Puerto deportivo tipo.

#### **3.2. Puntos de muestreo.**

Fueron muestreados 6 puertos deportivos, 1 puerto comercial y dos zonas de control en la Comunidad Valenciana. Los muestreos se realizaron durante los meses de junio y julio de 2017. La elección de los puertos se realizó en base a la disponibilidad natural, ya que las distribuciones espaciales de los mejillones no cubren toda la costa (Martínez Guijarro et al., 2015), y al acceso a cada uno de los puertos.

En la figura 3.2.1 se aprecia la ubicación de los puertos y puntos de control muestreados y analizados en este estudio. De norte a sur los puntos de muestreo fueron los siguientes: A (Marina de Benicarló), B (Puerto deportivo de Peñíscola), C (La marina de Valencia), D (Viñeta de Gandía), E (Puerto de Gandía), F (Puerto deportivo Real club Náutico de Gandia), G (Club Náutico de Oliva), H (Cabo de San Antonio), I (Puerto de Jávea).

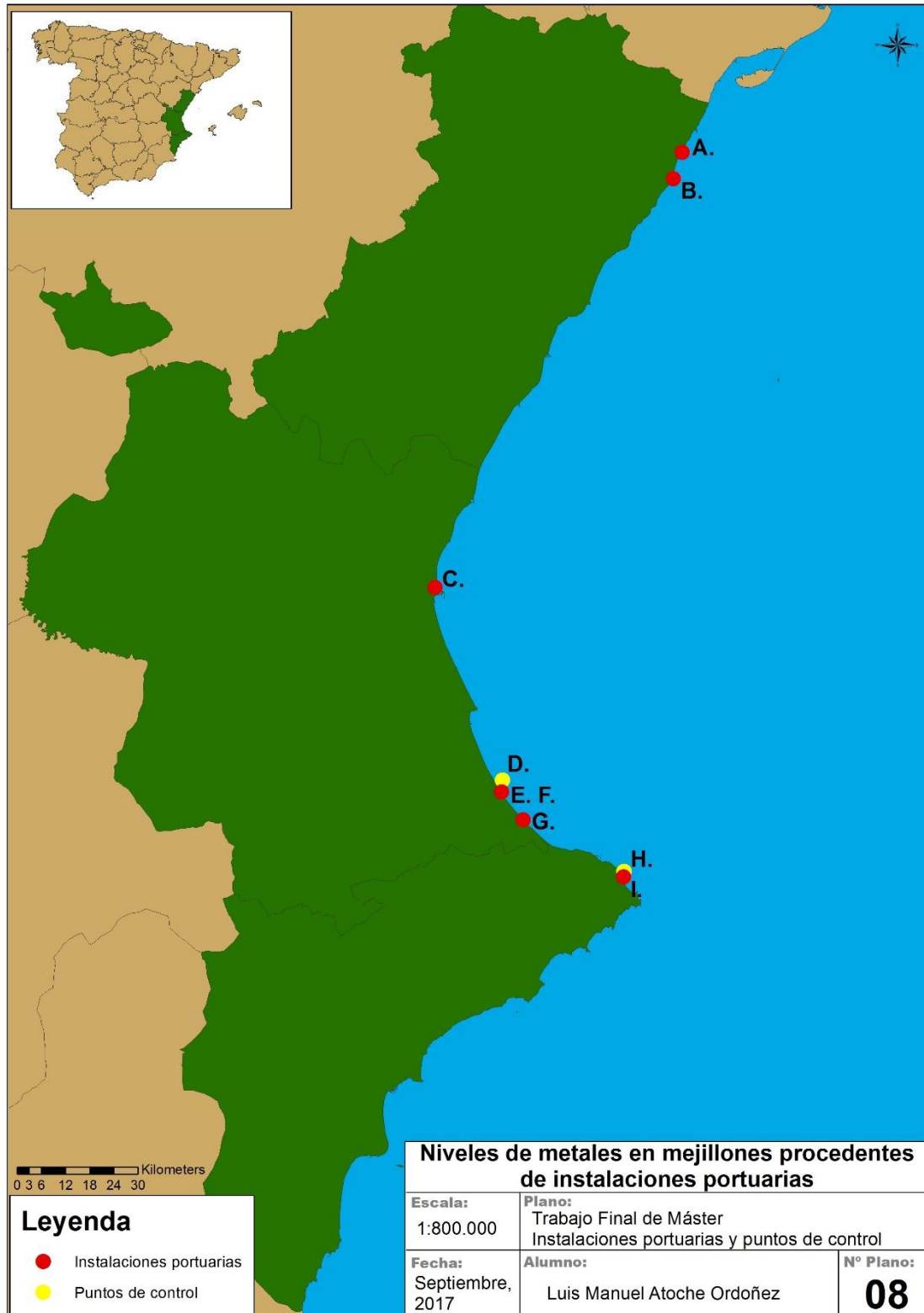


Figura 3.2.1 Mapa del área de estudio que muestra los puntos de muestreo ubicados en la Comunidad Valenciana.

- A. Marina de Benicarló (40° 24' 5 N, 000° 26' E): El puerto deportivo es de reciente creación, ha sido construido en la última década, al igual que el puerto pesquero. El puerto es seguro gracias al macizo y largo rompeolas que lo protege en caso de fuertes temporales. El puerto deportivo posee 300 amarres, eslora máxima de 20 m, calado de la bocana 4 m, calado de la dársena 3.70 m y una superficie total del puerto de 33980.25 m<sup>2</sup> («Marina de Benicarló», s. f.).
- B. Puerto deportivo de Peñíscola (40° 22' 00" N, 0° 25' 00" E): Es una pequeña instalación Náutica de 78 amarres dentro del puerto pesquero de la ciudad. Posee 44 embarcaciones pesqueras con un calado de 4.0 – 2.5 m y una superficie total del puerto de 36942 m<sup>2</sup>. («Puerto de Peñíscola - Generalitat Valenciana», s. f.).
- C. La Marina de Valencia (39° 27.7'N, 000° 18,5'W): Está situada en el corazón de Valencia, al norte del puerto comercial y junto a la playa de Malvarrosa. Cuenta con un calado promedio de 7.5 metros, distribuidos en tres localizaciones: el exclusivo pantalán central para megayates T-Dock Superyacht Marina, y dos zonas en las dársenas norte y sur. Así mismo, posee un puerto pesquero con un flota pesquera de 20 embarcaciones, en una superficie en la zona pesquera de 215159.2 m<sup>2</sup> («La Marina de València», s. f.)
- D. Viñeta de Gandía - Zona de control (39°1' 24" N 0°9' 3" E): Es una zona donde no hay mucho tránsito de embarcaciones ya que las muestras recogidas de esta zona de control se encuentra sumergidas a 6 metros de profundidad que corresponde a una boya del transecto permanente de estudio que tiene el IGIC en la playa de Gandia.
- E. Puerto de Gandía (0° 9' W, 38° 59' W): Se encuentra situado a 65 km al sur de la ciudad de Valencia y atiende un tráfico de carga general convencional, con una alto grado de especialización en la manipulación de mercancías como: bobina y pastel de papel, madera de importación y productos agrícolas de la zona. Así mismo, posee un calado de 6.5 m en



promedio, con un flota pesquera de 47 embarcaciones y una superficie de 235542.34 m<sup>2</sup> («Puerto de Gandía», s. f.).

- F. Real Club Náutico de Gandia (38° 59.8' N, 000° 09,2'W): El puerto deportivo está situado en el centro del arco sur de la costa del Golfo de Valencia, en la comarca de la Safor. Está protegido por un potente muelle exterior, con una entrada fácil, y posee un total de 301 amarres, anchura de bocana 30 m, sonda en bocana 3.80 m, sonda en dársena 2.8 a 3.50 m una superficie total del puerto deportivo de 34219.82 m<sup>2</sup> («Real Club Náutico Gandia», s. f.).
- G. Club Náutico de Oliva (38° 55'9'' N, 0° 05'5''W): Está en la dársena de la Goleta, muy orientado a la promoción de los deportes náuticos. Se encuentra ubicado a 2 km del casco urbano de Oliva. Ofrece 350 amarres en muelle y pantanales, eslora máxima de 12 m, calado de la bocana 2.5 m, calado de la dársena 2.5 m, ancho de la bocana 50 m y una superficie total de 33517.58 m<sup>2</sup> («Club Náutico Oliva», s. f.).
- H. Cabo San Antonio - Zona control (38°48'35"N 0°11'17"E): Es una reserva natural de espacio protegido de alto valor ecológico y de interés pesquero que ocupa 900 hectáreas. En sus fondos marinos se hallan especies tales como corales, praderas de posidonia oceánica, cigalas, meros, gorgonias, etc. La navegación en este espacio es sin motor y con velocidad moderada, así mismo poseen un amarre de boyas. («Reserva Marina Cabo San Antonio - Dénia», s. f.).
- I. Puerto de Jávea (38° 48' N, 00° 11' O): El puerto se halla situado al pie de los acantilados del cabo San Antonio, en un cortado de 170 metros. Esta situación le proporciona un paisaje incomparable y una buena protección interna. Posee zonas de puerto pesquero y puerto deportivo, con un calado de bocana de 5 m con una flota pesquera de 18 embarcaciones; el puerto deportivo cuenta con 386 amarres. La eslora máxima es de 25 m con un calado de 4.5 m -2.0 m y una superficie de 92756.92 m<sup>2</sup> («Puerto de Jávea - Generalitat Valenciana», s. f.).

### 3.3. Muestreo.

En cada una de las nueve áreas de estudio se recogieron en torno a 30 ejemplares de mejillones *Mytilus galloprovincialis* de tamaño similar para obtener resultados comparables. Las muestras se lavaron con agua de mar de cada uno de los sitios muestreados para eliminar suciedad y organismos incrustados.

Los mejillones como *Mytilus galloprovincialis* constituyen una especie centinela marina que se usa comúnmente como un bioindicador en el campo de la ecotoxicología. Debido a sus altos niveles de filtración, las concentraciones de contaminantes en los tejidos blandos de los mejillones sirven como un buen indicador de la fracción biodisponible de los contaminantes en los sitios que se emiten (Benali et al., 2017).



Figura 3.3.1 Mejillón *Mytilus galloprovincialis* en su medio natural.

### 3.4. Método de limpieza.

Para evitar que el material utilizado en todas las etapas del análisis, desde la preparación de la muestra hasta la determinación de los metales en el espectrofotómetro, esté contaminado con metales, se ha realizado un estricto procedimiento de limpieza de todo el material.

1. Quitar las marcas (etiquetas y escritos).
2. Lavar todo con agua destilada por dentro y por fuera tres veces.
3. Lavar todo con agua Milli-Q por dentro y por fuera una sola vez.
4. Colocar en baño de ácido nítrico al 20 % durante cinco días.
5. Lavar todo con agua destilada por dentro y por fuera tres veces.

6. Lavar todo con agua Milli-Q tres veces.
7. Dejar un día con agua Milli-Q.
8. Lavar con agua Milli-Q.
9. Llevar a una campana de flujo laminar hasta que esté seco.
10. Embalar los objetos uno a uno en sacos de plásticos.

### 3.5. Procesamiento de los organismos.

Una vez recolectadas las muestras, se seleccionaron en torno a 30 ejemplares de mejillones en cada uno de los puntos muestreados.



Figura 3.5.1 Muestras de mejillones.

Posteriormente, se procedió a medir cada una de las conchas de los mejillones seleccionados con un pie de rey, como se aprecia en la (figura 3.5.2).



Figura 3.5.2 Medidas de los mejillones con el pie de rey.

La parte externa del mejillón se ha de limpiar para evitar contaminar la parte interna del mejillón al abrirlos. Además, al abrirlos hay que tener mucho cuidado de no tocarlos con las manos: se utilizaron cucharas y cuchillos de plástico para no contaminar la muestra con metales (figura 3.5.3). Posteriormente la parte blanda de los mejillones procedentes de un mismo sitio se colocaron en una placa Petri (figura 3.5.4).



Figura 3.5.3 Extracción de la parte blanda de la concha de mejillón.



Figura 3.5.4 Muestras frescas en placas Petri.

Las muestras se secaron a 60 °C en una estufa durante 2 días (figura 3.5.6). Este paso es necesario puesto que en el análisis químico el valor de concentración del metal, se expresa en base al peso seco de mejillón.



Figura 3.5.6 Muestras en estufa a 60° C.

Una vez obtenidas las muestras secas se procedió a machacarlas con un mortero para su homogenización. En la figura 3.5.7 se puede ver el mejillón seco, y en la figura 3.5.8 el proceso de molturado y su aspecto final.



Figura 3.5.7 Muestras secas en las placas petri



Figura 3.5.8 Pulverizado de las muestras secas en mortero.

Finalmente, la muestra seca se guardó en un recipiente limpio y seco, en la figura 3.5.9 se observa los tubos con las 9 muestras analizadas.

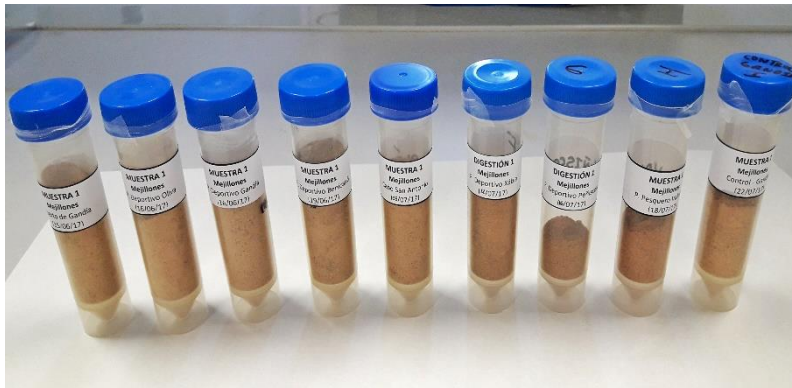


Figura 3.5.9 Muestras homogenizadas secas.

### 3.6. Método de análisis.

La determinación de los metales se realizó mediante el método descrito por (Niencheski, Baraj, Windom, & França, 2006). El método consiste en la digestión de la muestra con ácido nítrico y la posterior medida de la absorbancia de las digestiones.

Una vez se tiene la muestra seca, el primer paso es su digestión: se pesan alrededor de 0.5 g de muestra seca en un frasco de teflón y se añade 5 ml de ácido nítrico concentrado Suprapur ( $\text{HNO}_3$ ). Posteriormente, se dejan destapados los frascos durante una hora a temperatura ambiente, se tapan y

colocan los frascos de teflón en una placa calefactora a una temperatura de 100°C durante tres horas (figura 3.6.1).

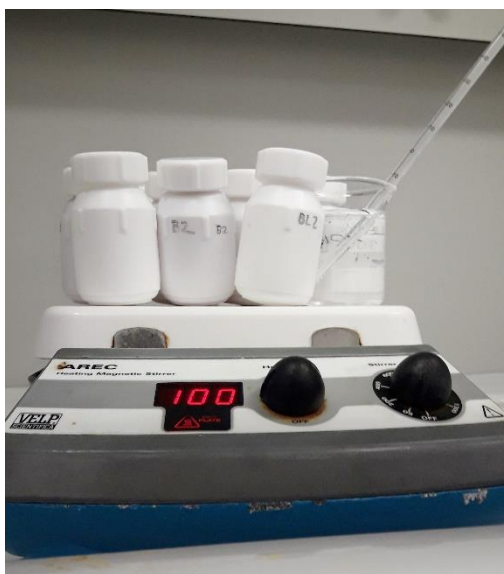


Figura 3.6.1 Muestras en placa calentadora.

Las digestiones se dejan enfriar durante 24 horas y, finalmente se lleva cuantitativamente a un volumen final de 25 ml (figura 3.6.2).

Las disoluciones se guardan en una nevera para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica. La digestión de cada muestra se realizó por triplicado.



Figura 3.6.2 Muestras digeridas.

Para el análisis de absorción atómica se prepararon patrones de cobre y zinc en agua, con un intervalo de concentraciones entre 0.1 y 0.2 mg/L para el Cu (figura 3.6.3) y entre 0.1 y 2.5 mg/L para el Zn (figura 3.6.4).

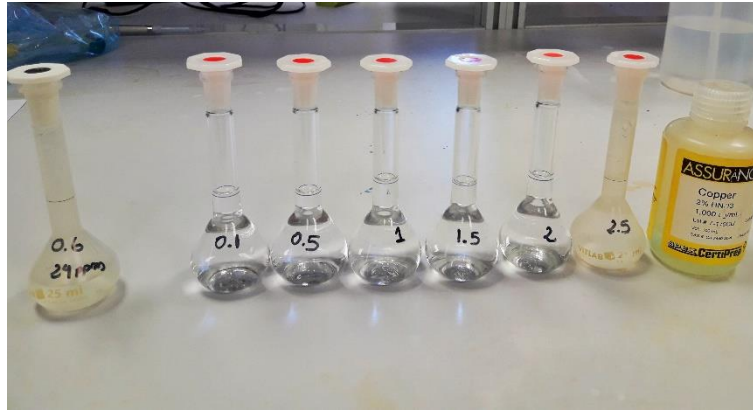


Figura 3.6.3 Patrones de Cobre.

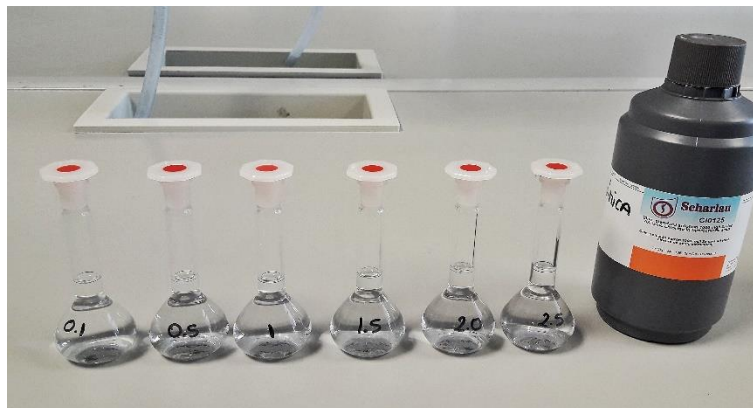


Figura 3.6.4 Patrones de zinc.

Finalmente, se midió la absorbancia de los patrones y las muestra en un Espectofotómetro de Absorción Atómica Varian Spectra 220 (figura 3.6.5).



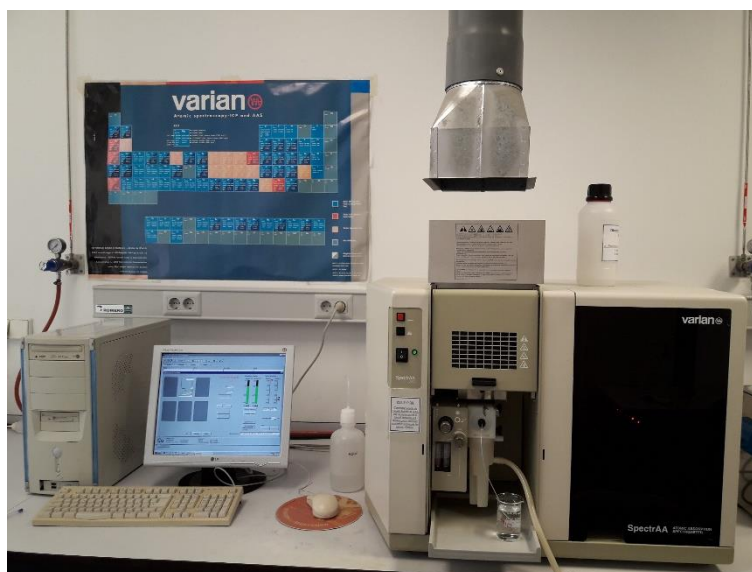


Figura 3.6.5 Espectrofotómetro de absorción atómica Varian Spectra 220.

### 3.7. Control de calidad del método.

Para establecer si el proceso de limpieza del material es correcto se prepararon dos blancos que siguen el mismo tratamiento de digestión que las muestras.

Por otro lado, para establecer si el proceso de digestión y medida es correcto, se realizó la digestión de una muestra de material de referencia certificado DORM-4 Fish poisson que contiene concentraciones conocidas de los metales analizados y que nos permitió evaluar la exactitud del método analítico. La digestión de cada muestra se realizó por triplicado.

Tabla 3.7.1 Concentraciones de material de referencia DORM – 4 Fish poisson, media  $\pm$  desviación estándar, los valores en mg/Kg de peso seco.

| Metal | Certificado    | Muestras       |
|-------|----------------|----------------|
|       | mg/kg          | mg/kg          |
| Cu    | 15.9 $\pm$ 0.9 | 15.7 $\pm$ 1.3 |
| Zn    | 52 $\pm$ 3     | 57 $\pm$ 3     |

Como se muestra la tabla 3.7.1 los valores obtenidos son similares a los de la muestra certificada (diferencia menor a 10%) por lo que se observa que el método de análisis es adecuado.

### **3.8. Tratamiento estadístico de los datos experimentales.**

Los datos se expresan como media desviación estándar de 9 sitios independientes, cada uno realizado por triplicado.

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el programa STATGRAPHICS Centurion XVII – 2014.

Previamente se comprobó si los datos tienen una distribución normal con correlación de datos en sesgo estandarizado y curtosis estandarizada. Se obtuvo como resultado que los datos proceden de una distribución normal con valores estadísticos que están dentro del rango -2 a +2.

Las variaciones de cada metal pesado se ensayó mediante el análisis de varianza: ANOVA simple. Las variables dependientes son la tallas, concentraciones de cobre y zinc y, las variables independientes los puertos, con un número de 27 observaciones y 9 niveles de puertos. El valor P de la prueba-F en la tabla ANOVA determino que sí hay diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

Finalmente se utilizó el análisis de componentes principales para definir nuevas variables no correlacionadas establecidas a partir de combinaciones lineales de las variables originales: concentraciones de cobre, las concentraciones de zinc, el número de embarcaciones, la profundidad, superficie del puerto y la talla de mejillones.

De modo que permitan explicar en su totalidad la mayor variabilidad total del conjunto de observaciones, con un número reducido de combinaciones lineales de las 6 variables donde se han extraído dos componentes principales, que tuvieron valores mayores o iguales que 1.0.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Talla de mejillones

Las biometrías de los mejillones *Mytilus galloprovincialis* las presentamos en la tabla 4.1.1 observándose que las muestras están en el rango de 28 mm – 98 mm para todos los puntos de muestreo; así mismo en la figura 4.1.1. Observamos que los mejillones con mayor tamaño en promedio los encontramos en el punto de muestreo I (Puerto de Jávea ), seguido de los puntos de muestreo A, E, B , D, F, G, H y el de menor tamaño es para el punto de muestreo C (La marina de Valencia).

Nuestros datos en talla promedio de 57 mm fueron mayores a los reportadas en estudios con mejillones: trasplante de mejillones para evaluar la calidad de agua en el Mediterráneo con una talla de  $45 \pm 5$  en promedio (Roméo, Hoarau, Garello, Gnassia-Barelli, & Girard, 2003), así mismo la talla media de los mejillones en el litoral de Andalucía fue de 30 mm – 40 mm (Benedicto, Rodríguez, Martínez-Gómez, Guerrero, & Jornet, 2003).

La cantidad de acumulación de metales pesados en mejillones va a depender de su crecimiento, donde la mayor concentración ira aumentando en proporción del peso y edad del mejillón

El tamaño de los mejillones en nuestro trabajo puede estar influido por la estacionalidad, disponibilidad de nutrientes, estado reproductivo y la tasa de crecimiento (Borković et al., 2005).

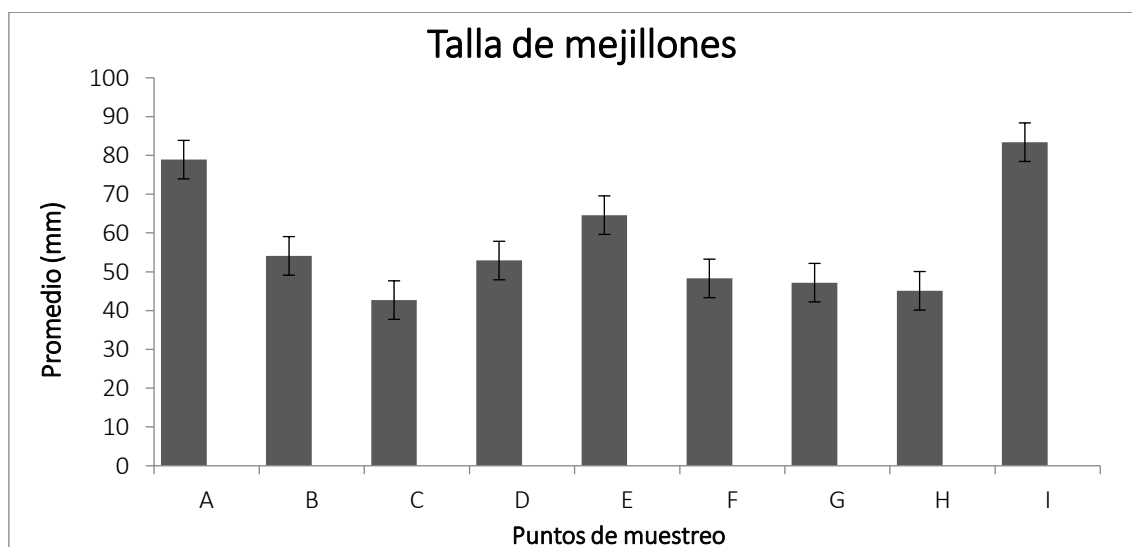


Figura 4.1.1 Talla promedio de muestras de mejillones.

Tabla 4.1.1 Resumen estadístico de talla de mejillones.

| Punto de muestreo | Número de unidades | Promedio (mm) | Desviación Estándar (mm) | Coefficiente de Variación | Mínimo (mm) | Máximo (mm) |
|-------------------|--------------------|---------------|--------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| A                 | 30                 | 79            | 7                        | 9.42%                     | 64.0        | 98.0        |
| B                 | 25                 | 54            | 4                        | 8.2%                      | 45.0        | 62.0        |
| C                 | 30                 | 43            | 8                        | 18%                       | 28.0        | 58.0        |
| D                 | 30                 | 53            | 5                        | 8.5%                      | 46.0        | 67.0        |
| E                 | 30                 | 65            | 6                        | 8.6%                      | 56.0        | 73.0        |
| F                 | 26                 | 48            | 10                       | 21%                       | 36.0        | 72.0        |
| G                 | 5                  | 47            | 10                       | 22%                       | 34.0        | 58.0        |
| H                 | 30                 | 45            | 3                        | 6.0%                      | 39.0        | 49.0        |
| I                 | 13                 | 83            | 8                        | 9.7%                      | 69.0        | 97.0        |
| Total             | 219                | 57            | ---                      | ---                       | 28.0        | 98.0        |

**Medias y 95.0 % de Fisher LSD**

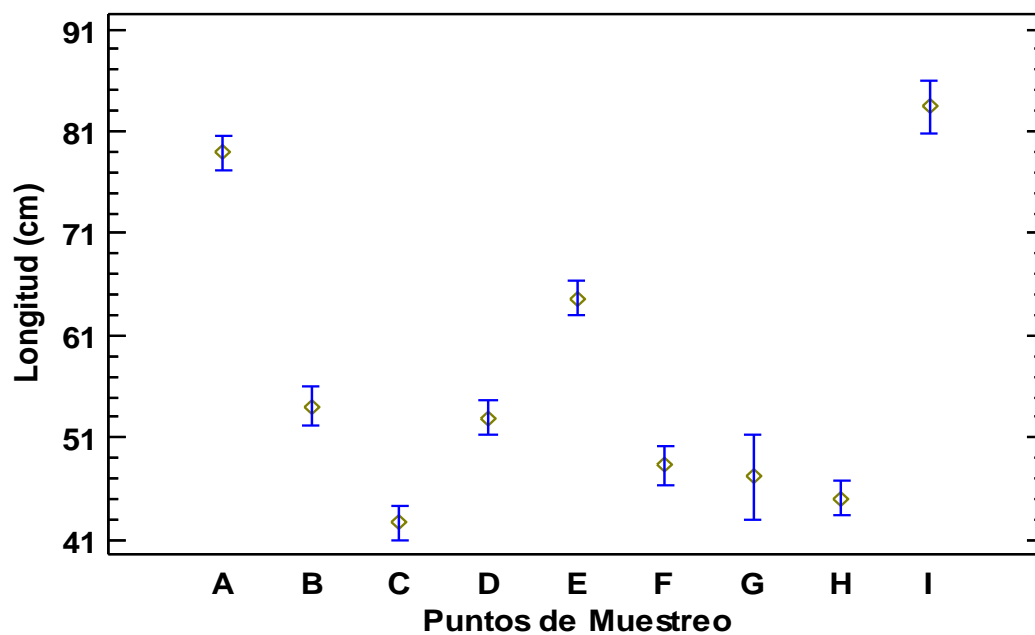


Figura 4.1.2 Anova de la longitud de los mejillones.

En la figura 4.1.2 se muestra la media de talla para cada uno de los niveles de puntos de muestreo. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Observándose que los puntos de muestreo en los 29 pares de intervalos no se solapan indicando que tiene diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% a excepción de los puntos de muestreo (B-D), (C-G), (C-H), (D-G), (F-G), (F-H) y (G-H) los cuales se llegan a solaparse. Los mejillones más grandes son los del punto de muestreo I (Puerto de Jávea) con una talla promedio de  $83 \pm 8$  mm y los más pequeños son de punto de muestreo C (La marina de Valencia) con una talla de  $43 \pm 8$  mm.

## 4.2. Concentraciones de cobre

Para evaluar la contribuciones en las concentraciones de cobre en los mejillones debido a las pinturas antifouling, es necesario tener una idea de cuáles son las concentraciones naturales de este metal. Para ello, se utilizaron las zonas de control D (Viñeta de Gandia) y H (Cabo de San Antonio), donde no existe una acumulación de embarcaciones confinadas en un volumen de agua relativamente pequeño. Las concentraciones de este estudio se expresan en mg/kg de peso seco, como se observa en la tabla 4.2.1.

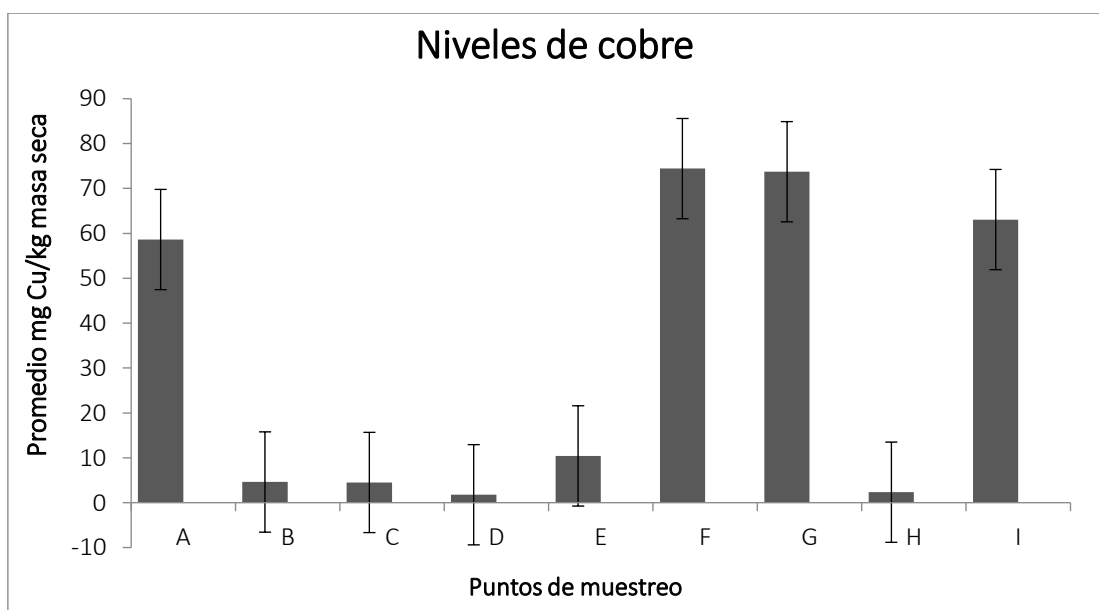


Figura 4.2.1 Niveles de cobre. Las barras de error representan el error estándar.

Tabla 4.2.1 Resumen estadístico para el cobre.

| <i>Punto de muestreo</i> | <i>Número de réplicas</i> | <i>Promedio Cu mg/kg</i> | <i>Desviación Estándar mg/kg</i> | <i>Coefficiente de Variación</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|
| A                        | 3                         | 59                       | 3                                | 5.81%                            | 54.75         | 61.12         |
| B                        | 3                         | 4.6                      | 0.6                              | 13.45%                           | 3.91          | 5.11          |
| C                        | 3                         | 4.5                      | 0.3                              | 7.04%                            | 4.26          | 4.86          |
| D                        | 3                         | 1.76                     | 0.06                             | 3.33%                            | 1.72          | 1.83          |
| E                        | 3                         | 10.42                    | 0.6                              | 5.51%                            | 10.02         | 11.08         |
| F                        | 3                         | 74                       | 7                                | 9.65%                            | 67.11         | 81.47         |
| G                        | 3                         | 73.7                     | 2.28                             | 3.09%                            | 71.19         | 75.59         |
| H                        | 3                         | 2.34                     | 0.04                             | 1.87%                            | 2.30          | 2.38          |
| I                        | 3                         | 63.07                    | 6.37                             | 10.10%                           | 55.73         | 67.24         |
| Total                    | 27                        | 32.6                     | -                                | -                                | 1.72          | 81.47         |

Para el análisis del cobre se realizó por triplicado. En la tabla 4.2.1 se muestra el resumen estadístico de la concentración de cobre para todos los puntos de muestreo, con un valor mínimo de  $1.76 \pm 0.06$  mg Cu/kg masa seca para el punto D (Viñeta de Gandia), el cual es un punto de muestreo control, y un máximo de  $74 \pm 7$  mg Cu/kg masa seca para el punto F (Puerto deportivo Real club Náutico de Gandia).

#### Medias y 95.0 % de Fisher LSD

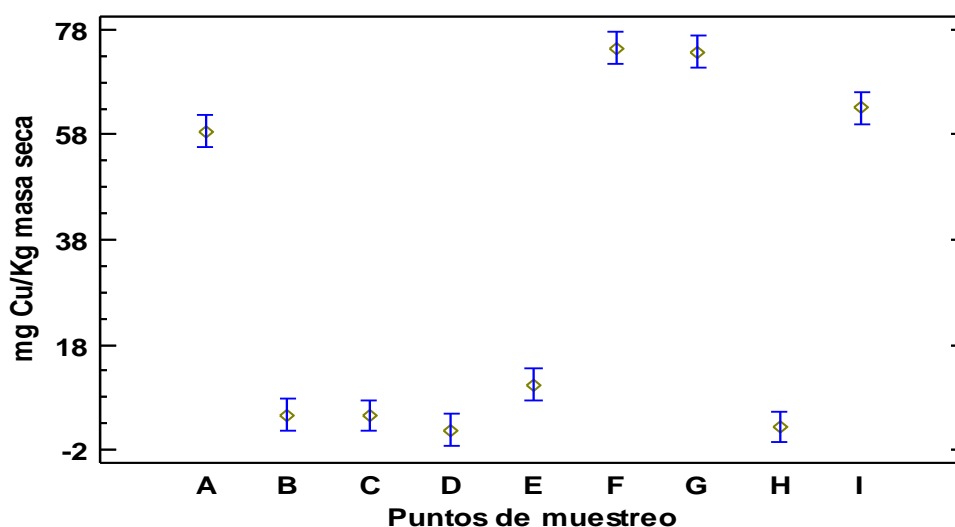


Figura 4.2.2 Anova de la concentración de cobre.

En la figura 4.2.2 se muestra la media de la concentración de cobre para cada uno de los puntos de muestreo junto con intervalos basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Se observó que 26 pares de los puntos de muestreo muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0 % de confianza. Así mismo hay 10 pares (A-I), (B-C), (B-D), (B-E), (B-H), (C-D), (C-E), (C-H) y (D-H) que se solapan, no existiendo diferencias estadísticamente significativas.

Tanto en la figuras 4.2.1 como el la figura 4.2.2 se observan dos intervalos de concentración del cobre muy diferenciados. Las muestras con unos niveles de concentración más altos, las encontramos en los puntos de muestreo F (Puerto deportivo Real club Náutico de Gandia), G (Club Náutico de Oliva), I (Puerto de Jávea), y A (Marina de Benicarló), todos ellos puntos correspondientes a puertos deportivos, situados en espacios muy confinados con una elevada cantidad de embarcaciones deportivas.

Por lo tanto confirmamos por estudios de otros autores que el cobre puede ser llevado al ambiente acuático cuando se usan como biocidas en las formulaciones de pinturas antifouling, el cual puede constituir un importante contaminante en los puertos deportivos ya que las pinturas antifouling se filtran continuamente de los cascos de los barcos, liberando residuos de pinturas que contienen cobre (Kiaune & Singhasemanon, 2011) y este al entrar al agua como un ion de cobre libre ( $\text{Cu}^+$ ), se oxida inmediatamente a  $\text{Cu}^{2+}$  (Thomas & Brooks, 2010). El  $\text{Cu}^{2+}$  (o  $\text{Cu}^{2+}$ ) es la forma más frecuente de encontrar al cobre en un medio acuático (G. Georgopoulos, A. Roy, M. J. Yono, 2001). El cobre es un oligoelemento esencial necesario a niveles minúsculos para el buen funcionamiento de todos los organismos. Sin embargo, cantidades excesivas de cobre interfieren con las funciones biológicas vitales. Diferentes especies, e incluso organismos dentro de la misma especie, pueden mostrar sensibilidades diferentes a los niveles elevados de cobre en la columna de agua. Los organismos tienen diferentes mecanismos a través de los cuales se encargan y procesan el cobre. Algunos organismos bioacumulan y almacenan cobre, mientras que otros regulan activamente sus niveles (Kiaune & Singhasemanon, 2011), sin embargo puede ser tóxico a concentraciones más altas (BurrIDGE, Weis, Cabello, Pizarro, & Bostick, 2010).

En la figura 4.2.1 se observa que los niveles más bajos de cobre son los de los puntos de muestreo D (Viñeta de Gandia), H (Cabo de San Antonio), que utilizamos como control, así como los de los puertos B (Puerto deportivo de Peñíscola), C (La marina de Valencia) y E (Puerto de Gandia), puertos con características diferentes a los puertos deportivos, debido a que poseen reducida cantidad de embarcaciones, mayoritariamente pesqueras.

El rango de concentraciones globales obtenidas en este estudio, con la mayor concentración de  $74 \pm 7$  mg/kg de peso seco en el Puerto deportivo Real club Náutico de Gandia y la menor concentración de  $1.76 \pm 0.06$  mg/kg de peso seco en la Viñeta de Gandia fueron mayores a los obtenidos en otros estudios que utilizaron mejillones en programas de vigilancia. En el mar Adriático las concentraciones de cobre oscilaban entre 1.65 – 12.1 mg/kg de peso seco (Jović & Stanković, 2014), los valores máximos de cobre en la región de Galicia fueron de 9.73 mg/kg peso seco (Besada, Manuel Andrade, Schultze, & José González, 2011) y de 5.45 peso seco en el litoral de Andalucía (Benedicto et al., 2003). En estudios realizados en la costa mediterránea, se han encontrado valores medios de cobre 21.2 mg/kg peso seco en las Islas Baleares (Deudero et al., 2007), mayores a los encontrados en otros estudios realizados en la costa mediterránea española con valores medios de 6.70 mg/kg de peso seco, aunque en dicho estudio se encontró una concentración de cobre de 22.42 mg/kg de peso seco en el puerto de Sagunto (Martínez Guijarro et al., 2015).

### **4.3. Concentraciones de zinc.**

Las concentraciones de zinc en este estudio se muestran en la tabla 4.3.1 y en la figura 4.3.1. Se ha obtenido la mayor concentración de zinc en el punto de muestreo B (Puerto deportivo de Peñíscola), seguido de los puntos de muestreo H, I, C, D, A, E y G; en el punto F (Puerto deportivo Real club Náutico de Gandia) se ha obtenido la menor concentración.

Los resultados obtenidos para la concentración zinc en este estudio están dentro del rango de concentración obtenidos por otros estudios en otras partes del mar Mediterráneo (Joksimović, Kljajić, & Stanković, 2012).



Según la tabla 4.3.1 el promedio de las concentraciones de zinc es de 119 mg/kg de peso seco (64 – 173). Estos resultados son inferiores a los obtenidos en otros estudios que han usado también mejillones. Así, la concentración de zinc obtenida en un estudio realizado en el mar Adriático osciló entre 34.4 – 311 mg/kg de peso seco (Jović & Stanković, 2014) y entre 86 - 425 mg/kg peso seco en un estudio realizado en el litoral de Andalucía (Benedicto et al., 2003). Por otra parte, en otros estudios se encontró que, la concentración media de zinc fue 226 mg/kg peso seco en las costas de Galicia (Besada et al., 2011), 123.75 mg/kg de peso seco costa en la mediterránea española (Martínez Guijarro et al., 2015) y de 124.5 mg/kg peso seco con valores comprendidos entre 48.9 – 316.7 mg/kg peso seco, en las islas Baleares (Deudero et al., 2007).

Las concentraciones de zinc son mayores que las de cobre en todos los casos en nuestro estudio. Esta diferencia es debido a la constante de velocidad de absorción de los mejillones. Según estudios en mejillones, la absorción es más alta para el zinc, seguida del cobre (Chong & Wang, 2001). Así mismo la acumulación de altos niveles de zinc incluso en zonas presumiblemente no contaminadas debe estar relacionado con los hábitos de alimentación, por un lado, y con las características morfológicas y fisiológicas por otro lado (Cubadda, Conti, & Campanella, 2001).

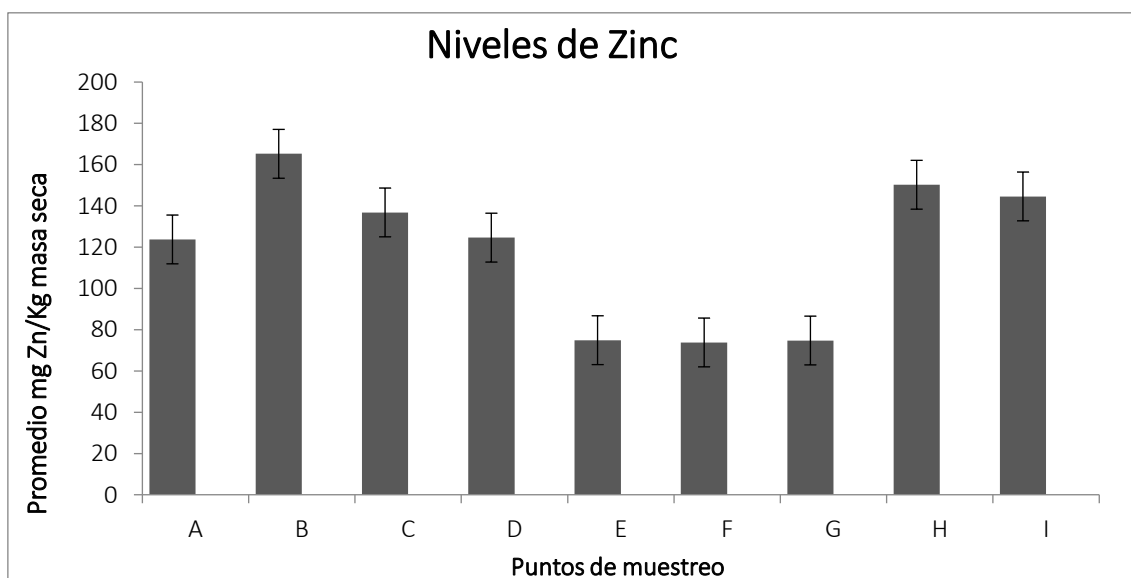


Figura 4.3.1 Niveles promedio de zinc. Las barras de error representan el error estándar.

Tabla 4.3.1 Resumen estadístico para el zinc.

| Punto de muestreo | Número de réplicas | Promedio Zn mg/kg | Desviación Estándar mg/kg | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| A                 | 3                  | 124               | 15                        | 12.40%                    | 107.00 | 137.15 |
| B                 | 3                  | 165               | 11                        | 6.85%                     | 152.32 | 173.43 |
| C                 | 3                  | 137               | 8                         | 5.75%                     | 131.37 | 145.84 |
| D                 | 3                  | 125               | 12                        | 9.51%                     | 114.11 | 137.47 |
| E                 | 3                  | 75                | 10                        | 13.43%                    | 63.68  | 83.10  |
| F                 | 3                  | 74                | 0.6                       | 0.84%                     | 73.13  | 74.35  |
| G                 | 3                  | 74.75             | 5.20                      | 6.96%                     | 68.74  | 77.99  |
| H                 | 3                  | 150.24            | 4                         | 2.50%                     | 147.28 | 154.46 |
| I                 | 3                  | 144.58            | 12                        | 8.34%                     | 132.64 | 156.75 |
| Total             | 27                 | 118.74            | ---                       | ---                       | 63.68  | 173.43 |

Medias y 95.0 % de Fisher LSD

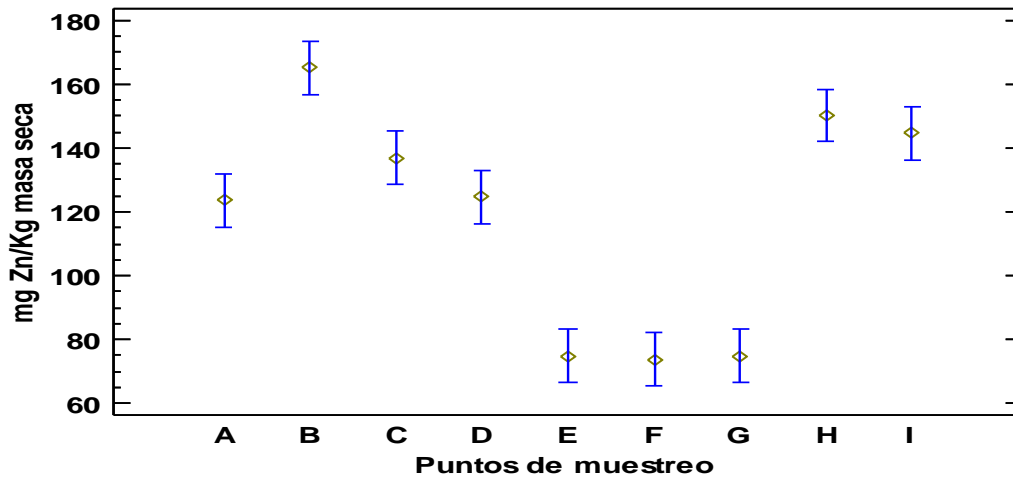


Figura 4.3.2 Anova de Zinc.

Los intervalos mostrados alrededor de cada valor de concentración medio en la Figura 4.3.2 están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher indicando la media de Zinc para cada uno de los niveles de los puntos de muestreo. Se ha obtenido que 26 pares de cada uno de los puntos de muestreo no se solapan, indicando que tiene diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% a diferencia de

los puntos de muestreo (A-C), (A-D), (B-H), (C-D), (C-H), (C-I), (E - F), (E - G), (F - G) Y (H - I) los cuales se llegan a solaparse.

#### 4.4. Análisis Multivariado – Componentes principales

Se realizó el análisis estadístico de componentes principales para obtener un número reducido de combinaciones lineales de las 6 variables (concentraciones de cobre y zinc, el número de embarcaciones, el calado, superficie y la talla de los mejillones), donde las muestras utilizadas para las componentes principales solo proceden de los puntos de muestreo que pertenecen a puertos descartando los puntos de muestreo de zonas control.

Las combinaciones lineales de las variables explican la totalidad de los datos, extrayéndose dos componentes principales que explican el 80.045 % de la variabilidad de los datos originales, las dos componentes tuvieron eigenvalores mayores o iguales que 1.0 indicados en la tabla 3.4.1.

Tabla 4.4.1 Análisis de componentes principales.

| <b>Componente /<br/>Número</b> | <b>Eigenvalor</b> | <b>Porcentaje de<br/>Varianza</b> | <b>Porcentaje<br/>Acumulado</b> |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1                              | 3.4863            | 58.105                            | 58.105                          |
| <b>2</b>                       | <b>1.31638</b>    | <b>21.940</b>                     | <b>80.045</b>                   |
| 3                              | 0.915672          | 15.261                            | 95.306                          |
| 4                              | 0.209339          | 3.489                             | 98.795                          |
| 5                              | 0.0668872         | 1.115                             | 99.910                          |
| 6                              | 0.00542266        | 0.090                             | 100.000                         |

Tabla 4.4.2 Tabla de pesos de componentes.

|                              | <b>Componente<br/>1</b> | <b>Componente<br/>2</b> |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cu                           | 0.488913                | -0.232899               |
| Zn                           | -0.0903594              | 0.779741                |
| Embarcaciones                | 0.512136                | 0.0315385               |
| Superficie (m <sup>2</sup> ) | -0.462222               | -0.0857458              |
| Profundidad (m)              | -0.494702               | -0.0527278              |
| Talla (mm)                   | 0.179266                | 0.571519                |

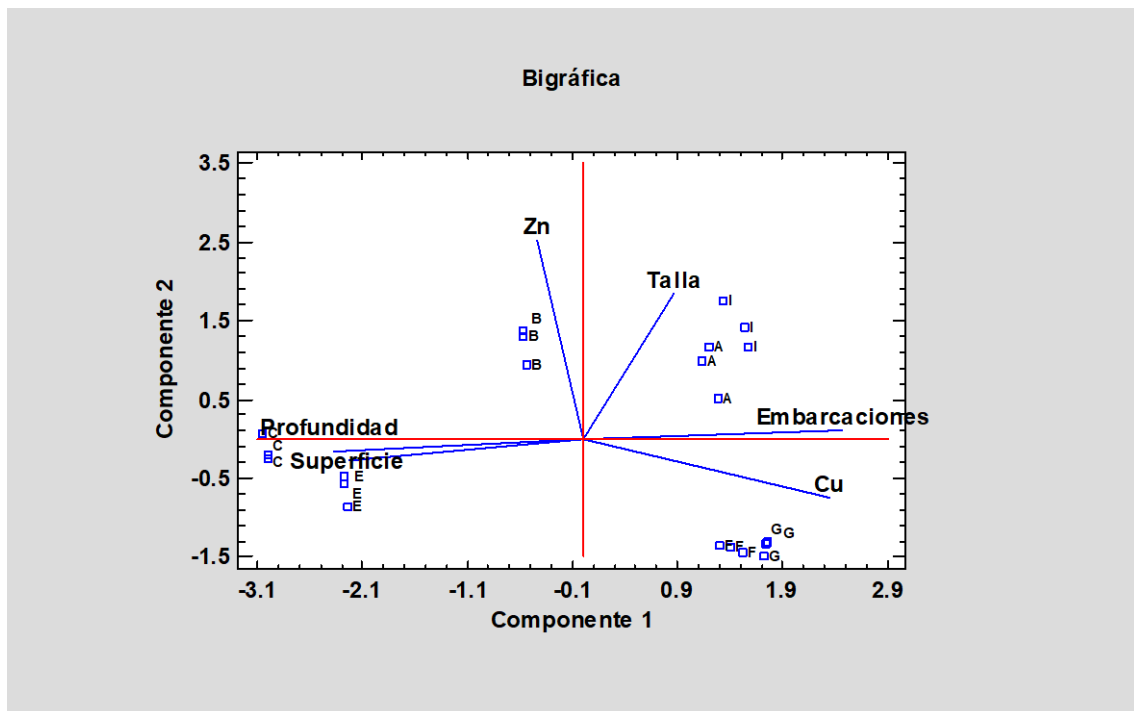


Figura 4.4.1 Biográfica de componentes principales en 2D.

Componente Principal 1: Explica el 58.105 % de varianza según la tabla 4.4.2, donde la mayor correlación positiva es para el número de embarcaciones, concentración de cobre y talla de los mejillones, mientras las correlaciones negativas son para profundidad y superficie, correlaciones asociadas a la concentración. Denominando a esta componente “bioacumulación debida a la contaminación” porque aquí el cobre se correlaciona positivamente con el número de embarcaciones y negativamente con el volumen (profundidad y superficie) de agua confinada en el puerto.

Los puntos de muestreo que muestran valores altos en cobre como se observa en la figura 4.4.1 son para el punto de muestreo F (Puerto deportivo Real club Náutico de Gandia) y G (Club Náutico de Oliva) donde estos son puertos deportivos con una reducida superficie y una elevada cantidad de embarcaciones; así mismo observamos que el punto de muestreo I (Puerto de Jávea) tiene aportaciones altas de concentración de cobre ligadas al mayor número de embarcaciones y las tallas de mejillones que encontramos en este sitio de muestreo. Por otro lado los puntos de muestreo C (La marina de Valencia) y E (Puerto de Gandia) son puntos opuestos que van a depender de la profundidad y la superficie, donde la característica de estos puertos va a ser la

concentración presente debido a sus características como una mayor superficie, profundidad y un número reducido de embarcaciones, por ello en estos puntos de muestreo los mejillones tienen menor concentración de cobre.

Componente Principal 2: Explica el 21.94 % de varianza según la tabla 4.4.2, donde la mayor correlación positiva es para la concentración de zinc seguida de la talla, mientras que las correlaciones negativas son para superficie y profundidad. Denominando a esta componente principal “bioacumulación de fondo o base” ya que el zinc se correlaciona solo positivamente con el tamaño y este, al ser un indicador del tiempo de vida, nos sugiere que mientras más longevo son los mejillones más volumen de agua han filtrado y más metales han retenido. El punto de muestreo que muestra la mayor cantidad de zinc es el punto B (Puerto deportivo de Peñíscola) seguido del punto I (Puerto de Jávea) donde estos puntos están en el grupo de los mejillones con mayor tamaño de todos los puntos de muestreo como se observa en la tabla 4.1.1.

## CONCLUSIONES

La bioacumulación de contaminantes en zonas de agua cerradas constituye un problema ambiental importante en los ecosistemas marinos. Estos contaminantes pueden conducir no sólo al deterioro a largo plazo de las poblaciones acuáticas, sino también al aumento de la vulnerabilidad de los organismos acuáticos.

Los puertos son considerados entornos modelos para desarrollar y validar procedimiento de monitoreo de campo, utilizando al mejillón *Mytilus galloprovincialis* como bioindicador de metales pesados.

En el presente estudio podemos concluir que las concentraciones de cobre obtenidas de los bivalvos *Mytilus galloprovincialis* son mayores en los puntos de muestreo pertenecientes a puertos deportivos que en los puertos pesqueros y, por supuesto, que en las zonas de control. Esto es debido a que los puertos deportivos hay un elevado número de embarcaciones con pinturas antiincrustantes (que contienen cobre) en sus cascos en un área. En los puntos de control (Viñeta de Gandia y Cabo de San Antonio) las concentraciones de cobre son muy bajas debido al menor tráfico de embarcaciones y la mayor dilución. La concentración de cobre en puertos deportivos ha sido hasta 40 veces superior a la concentración de este metal en los ambientes marinos no contaminados.

La concentración de zinc, por su parte, está relacionada con la talla de mejillones debido a que éstos tienen una elevada tasa de absorción en zinc.

Estos resultados indican la necesidad de monitorear los niveles de biocidas presentes en medios acuáticos (organismos, agua de mar y sedimentos), ya que muchas especies en ecosistemas marinos costeros pueden convertirse en blancos no deseados de los biocida liberado por los tratamientos antifouling.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A., Abel, P. D., Arnold, D. W., & Milne, A. (2000). Cost-benefit analysis of the use of TBT: The case for a treatment approach. *Science of the Total Environment*, 258(1-2), 5-19. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00505-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00505-2)
- Baumard, P., Budzinski, H., & Garrigues, P. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(5), 765-776. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170501>
- Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., & Chèvre, N. (2017). Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.028>
- Benedicto, J., Rodríguez, C., Martínez-Gómez, C., Guerrero, J., & Jornet, A. (2003). Distribución espacial y tendencias temporales de los niveles de metales traza en el litoral de Andalucía utilizando mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 como organismo indicador: 1991-2003. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*, 19(1-4), 31-39. Recuperado a partir de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-26244443963&partnerID=tZOtx3y1>
- Besada, V., Manuel Andrade, J., Schultze, F., & José González, J. (2011). Monitoring of heavy metals in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast. *Continental Shelf Research*, 31(5), 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2010.04.011>
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., ... Regoli, F. (2008). Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, 89(4), 257-266.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.011>

- Borković, S. S., Šaponjić, J. S., Pavlović, S. Z., Blagojević, D. P., Milošević, S. M., Kovačević, T. B., ... Saičić, Z. S. (2005). The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(4), 366-374. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.08.001>
- Bresler, V., & Fishelson, L. (1994). Microfluorometrical study of bioaccumulation of benzo(a)pyrene and marker xenobiotics in the bivalve *Donax trunculus* from clean and polluted sites along the Mediterranean shore of Israel, 19, 193-202. Recuperado a partir de <http://www.int-res.com/articles/dao/19/d019p193.pdf>
- Burrige, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1-4), 7-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. En *Science of the Total Environment* (Vol. 247, pp. 295-311). [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Cantillo, A. . (1998). Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with Worldwide Mussel Watch Studies. *Marine Pollution Bulletin*, 36(9), 712-717. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00049-6)
- Cao, S., Wang, J., Chen, H., & Chen, D. (2011). Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin*, 56(7), 598-612. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4158-4>
- Carić, H., Klobučar, G., & Štambuk, A. (2016). Ecotoxicological risk assessment of antifouling emissions in a cruise ship port. *Journal of Cleaner Production*, 121, 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.08.072>
- Champ, M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending



actions, related costs and benefits. *Science of The Total Environment*, 258(1-2), 21-71. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00506-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00506-4)

Chemicals, U. N. E. . (2002). Regionally based assessment of persistent toxic substances. *Regional Report. Programme des Nations Unies pour l'environnement*.

Chong, K., & Wang, W.-X. (2001). Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr, and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Pollution*, 115(1), 107-121. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00087-2)

Club Náutico Oliva. (s. f.). Recuperado 14 de agosto de 2017, a partir de <https://www.iamarre.com/club-nautico-oliva>

Cubadda, F., Conti, M. E., & Campanella, L. (2001). Size-dependent concentrations of trace metals in four Mediterranean gastropods. *Chemosphere*, 45(4-5), 561-569. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00013-3)

Dafforn, K. A., Lewis, J. A., & Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(3), 453-465. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.012>

Deudero, S., Box, A., March, D., Valencia, J. M., Grau, A. M., Tintore, J., & Benedicto, J. (2007). Temporal trends of metals in benthic invertebrate species from the Balearic Islands, Western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9), 1545-1558. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.05.012>

Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & de Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28(7), 649-669. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>

Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., & Regoli, F. (2001). DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: A field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquatic Toxicology*, 53(1), 19-32. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00159-4)

- Furdek, M., Vahčić, M., Ščančar, J., Milačić, R., Kniewald, G., & Mikac, N. (2012). Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. *Marine Pollution Bulletin*, 64(2), 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.12.009>
- G. Georgopoulos, A. Roy, M. J. Yono, P. (2001). ENVIRONMENTAL COPPER: ITS DYNAMICS AND HUMAN EXPOSURE ISSUES. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 4(4), 341-394. <https://doi.org/10.1080/109374001753146207>
- Garaventa, F., Pellizzato, F., Faimali, M., Terlizzi, A., Medakovic, D., Geraci, S., & Pavoni, B. (2006). Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. *Hydrobiologia*, 555(1), 281-287. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1124-2>
- Gipperth, L. (2009). The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. *Journal of Environmental Management*, 90(SUPPL. 1), S86-S95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.08.013>
- Gray, J. S. (1992). Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection. *Marine Pollution Bulletin*, 25(1-4), 48-50. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(92\)90184-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(92)90184-8)
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1541-1560. <https://doi.org/10.3390/ijms13021541>
- Guevara-Riba, A., Sahuquillo, A., Rubio, R., & Rauret, G. (2004). Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Science of the Total Environment*, 321(1-3), 241-255. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.08.021>
- Joksimović, D., Kljajić, Z., & Stanković, S. (2012). Concentrations of Heavy Metals ( Zn , Cu , Pb , Cd and As ) in the Mediterranean Mussel *Mytilus Galloprovincialis* from the Montenegrin Coast of the Southeastern Adriatic Sea. *Water Research and Management*, 2(3), 3-9.

- Jones, B., & Bolam, T. (2007). Copper speciation survey from UK marinas, harbours and estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 54(8), 1127-1138. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.04.021>
- Jović, M., & Stanković, S. (2014). Human exposure to trace metals and possible public health risks via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic coastal area. *Food and Chemical Toxicology*, 70, 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.012>
- Karlsson, J., Ytreberg, E., & Eklund, B. (2010). Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels. *Environmental Pollution*, 158(3), 681-687. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.024>
- Kiaune, L., & Singhasemanon, N. (2011). Pesticidal Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity (pp. 1-26). Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_1)
- La Marina de València. (s. f.). Recuperado 15 de agosto de 2017, a partir de <http://www.lamarinadevalencia.com/sub/39/servicios-e-instalaciones.html>
- Lau, P. ., & Wong, H. . (2003). Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 46(12), 1563-1572. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00321-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00321-7)
- Lewis, J. A. (1998). Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. *Materials Forum*, 22(November), 41-61.
- Löschau, M., & Krätke, R. (2005). Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints. *Environmental Pollution*, 138(2), 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.015>
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., & Rocher, B. (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*, 70(1), 83-93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.003>

- Marina de Benicarló. (s. f.). Recuperado 14 de agosto de 2017, a partir de <http://www.marinabenicarlo.com/descripcion>
- Martínez Guijarro, R., Romero, I., & Pachés, M. (2015). A COASTAL POLLUTION STUDY : HEAVY METAL CONTENT IN MARINE BIVALVES FROM THE SPANISH MEDITERRANEAN, *5*(4), 247-257.
- Matthiessen, P., Reed, J., & Johnson, M. (1999). Sources and potential effects of copper and zinc concentrations in the estuarine waters of Essex and Suffolk, United Kingdom. *Marine Pollution Bulletin*, *38*(10), 908-920. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00090-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00090-9)
- Moore, M. (1985). Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, *16*(4), 134-139. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(85\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0025-326X(85)90003-7)
- Moore, M. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series*, *46*, 81-89. <https://doi.org/10.3354/meps046081>
- Moore, M. (1993). Biomarkers of contaminant exposure and effect: a way forward in marine environmental toxicology. *Science of the Total Environment*, *134*(SUPPL. 2), 1335-1343. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80140-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80140-8)
- Niencheski, L. F. H., Baraj, B., Windom, H. L., & França, R. G. (2006). Natural Background Assessment and Its Anthropogenic Contamination of Cd , Pb , Cu , Cr , Zn , Al And Fe in the Sediments of the Southern Area of Patos Lagoon. *Journal of Coastal Research, ICS 2004* ((39), 1040-1043.
- Obhodas, J., Valkovic, V., Davorin, S., Matika, D., & Pavic, I. (2009). Environmental security of the port and harbors' sediments. En C. S. Halvorson, ??rka O. Southern, B. V. K. Vijaya Kumar, S. Prabhakar, & A. A. Ross (Eds.), *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* (Vol. 7306, p. 73061L). International Society for Optics and Photonics. <https://doi.org/10.1117/12.817534>
- Prime, M., Peharda, M., Jelić, K., Mladineo, I., & Richardson, C. A. (2006). The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic.

*Marine Pollution Bulletin*, 52(7), 810-812.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.013>

Puerto de Gandía. (s. f.). Recuperado 15 de agosto de 2017, a partir de [http://www.puertos.es/Memorias\\_Anuales/2014/pdf/Valencia/09\\_PuertosSaguntoGandia.pdf](http://www.puertos.es/Memorias_Anuales/2014/pdf/Valencia/09_PuertosSaguntoGandia.pdf)

Puerto de Jávea - Generalitat Valenciana. (s. f.). Recuperado 14 de agosto de 2017, a partir de <http://www.habitatge.gva.es/web/puertos/puertos-cv/puertos-gv/javea/informacion-general>

Puerto de Peñíscola - Generalitat Valenciana. (s. f.). Recuperado 19 de agosto de 2017, a partir de <http://www.habitatge.gva.es/web/puertos/puertos-cv/puertos-gv/peniscola/informacion-general>

Quevauviller, P., Lavigne, R., Pinel, R., & Astruc, M. (1989). Organo-tins in sediments and mussels from the Sado estuarine system (Portugal). *Environmental Pollution*, 57(2), 149-166. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90007-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90007-9)

Real Club Náutico Gandia. (s. f.). Recuperado 19 de agosto de 2017, a partir de <http://www.rcngandia.com/servicios.php?idioma=es&d=1>

Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., & Nigro, M. (2004). Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.011>

Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G. W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., & Bompadre, S. (2002). Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: The relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 912-922. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00120-0)

Reserva Marina Cabo San Antonio - Dénia. (s. f.). Recuperado 14 de agosto de 2017, a partir de <http://www.denia.net/reserva-marina-san-antonio>

- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., & Girard, J. P. (2003). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122(3), 369-378. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00303-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00303-2)
- Sarasquete, M. C., Gonzales de Canales, M. L., & Gimeno, S. (1992). Comparative histopathological alterations in the digestive gland of marine bivalves exposed to Cu and Cd. *European journal of histochemistry: EJH*, 36(2), 223-232. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380856>
- Srinivasan, M., & Swain, G. W. (2007). Managing the use of copper-based antifouling paints. *Environmental Management*, 39(3), 423-441. <https://doi.org/10.1007/s00267-005-0030-8>
- Steinberg, P. D., De Nys, R., & Kjelleberg, S. (2002). Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers. <https://doi.org/10.1023/A:1020789625989>
- Thomas, K., Raymond, K., Chadwick, J., & Waldock, M. (1999). The effects of short-term changes in environmental parameters on the release of biocides from antifouling coatings: cuprous oxide and tributyltin. *Applied Organometallic Chemistry*, 13(6), 453-460. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199906\)13:6<453::AID-AOC864>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199906)13:6<453::AID-AOC864>3.0.CO;2-O)
- Thomas, & Brooks, S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, 26(1), 73-88. <https://doi.org/10.1080/08927010903216564>
- Vetere, V. F., Pérez, M. C., Romagnoli, R., Stupak, M. E., & Amo, B. (1997). Solubility and toxic effect of the cuprous thiocyanate antifouling pigment on barnacle larvae. *Journal of Coatings Technology*, 69(3), 39-45. <https://doi.org/10.1007/BF02696144>
- Warnken, J., Dunn, R. J. K., & Teasdale, P. R. (2004). Investigation of recreational boats as a source of copper at anchorage sites using time-integrated diffusive gradients in thin film and sediment measurements.

*Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 833-843.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.06.012>

Ytreberg, E., Bighiu, M. A., Lundgren, L., & Eklund, B. (2016). XRF measurements of tin, copper and zinc in antifouling paints coated on leisure boats. *Environmental Pollution*, 213, 594-599.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.029>

Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., ... Cajaraville, M. P. (2007). Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental Pollution*, 148(1), 236-250.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.022>

