UNIVERSIDADE DE ÉVORA

&

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Influência dos invertebrados estuarinos bentónicos na especiação de metais pesados: caso de estudo "*Scrobicularia plana*"

Givaldo Silvano dos Reis

ORIENTAÇÃO: Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida

Professora Doutora Maria Isabel Caçador

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

MESTRADO EM GESTÃO E CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS NATURAIS

ÉVORA

2010

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

&

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Influência dos invertebrados estuarinos bentónicos na especiação de metais pesados: caso de estudo "*Scrobicularia plana*"

Givaldo Silvano dos Reis

Licenciado em Ciências Biológicas

Tese apresentada à Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre em Gestão e Conservação dos Recursos Naturais.

Orientação:

Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida

(Professor Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Évora)

Professora Doutora Maria Isabel Caçador

(Professora Auxiliar com Agregação, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.

MESTRADO EM GESTÃO E CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS NATURAIS

ÉVORA

INDICE

AGRADECIMENTOS I

LISTA DE FIGURAS III

LISTA DE TABELAS IV

SIGLAS E ACRÓNIMOS V

RESUMO 1

ABSTRACT 3

1 INTRODUÇÃO 6

1.1. OBJECTIVOS 10

1.1.1. OBJECTIVO GERAL 10

1.1.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS 10

2 LOCAL DE ESTUDO 12

2.1 ESTUÁRIO DO TEJO 12

2.2 DEFINIÇÃO DE SAPAL 12

2.3 SAPAL DAS HORTAS (ALCOCHETE) 13

2.4 SAPAL DO ROSÁRIO (MOITA) 14

3 CASO DE ESTUDO 15

3.1. *SCROBICULARIA PLANA* – ECOLOGIA 15

4 MATERIAL E MÉTODOS 17

4.1. CONSTRUÇÃO DO MESOCOSMO 17

4.2. PLANO DE AMOSTRAGEM 18

4.3. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO PROJECTO 18

4.4. RECOLHA E PREPARAÇÃO DO SEDIMENTO 18

4.5. RECOLHA E PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS 20

4.6. RECOLHA DOS *PELLETS* 20

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA (TGA) 21

4.8. ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO DE PARTÍCULAS 22

4.9. EXTRACÇÃO SEQUENCIAL DOS METAIS 23

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA 24

5 RESULTADOS 25

5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA 25
5.2 ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO DE PARTÍCULAS 26
5.3 ACUMULAÇÃO DE METAIS 28
5.4 ESPECIAÇÃO DE METAIS 28
6 DISCUSSÃO 37
7 REFERÊNCIAS 42

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente quero agradecer a Deus pela protecção constante, por tudo que tenho alcançado na vida, por ter sempre posto no meu caminho pessoas maravilhosas, pela força e coragem que tenho adquirido sempre para vencer todos os percalços e desafios da vida.
- Aos meus pais que mesmo velhinhos têm sido ao longo da minha vida os meus grandes mestres.
- As minhas lindas filhas Ana Catarina e Pauline, pelas pessoas que são parte da minha vida também deste trabalho.
- Aos meus irmãos, Rosevaldo, Ivando, Gilberto, Josevaldo e Marilene, pelas pessoas que são e acima de tudo são realmente meus irmãos e a minha cunhada Ana.
- Ao Prof. Pedro Raposo de Almeida (orientador), pelas oportunidades e pela confiança que me concedeu principalmente quando abrindo as portas do CO, pelas palavras sábias e apoio técnico sempre.
- À Prof.ª Isabel Caçador (co-orientadora) pelo apoio e disponibilidade demonstrada.
- A Profª. Teresa Ferreira pelo apoio em todos os aspectos que obtive durante todo o tempo que estive no ISA e todos os outros professores do mestrado.
- Aos colegas de mestrado, pelo tempo de convivência juntos por estes quase dois anos, período que me proporcionou muitos momentos de reflexão e aprendizado.
- A doutoranda Sílvia Pedro, colega de projecto, pela disposição e dedicação, que apesar do seu volume de trabalho me ajudou bastante.
- A todo pessoal do Centro de Oceanografia da FCUL em especial a turma do laboratório de Zoologia Marinha pela convivência, carinho e apoio.

- A Xerox Comércio & Indústria Ltd. nas pessoas do Director Eng. Adilson Ramos, do Gerente de Qualidade Eng. Luciano Coutinho, aos analistas químicos das Plantas de Toner e OPC, Álvaro, Emanuel Rocha, Sérgio da Paixão, Carlos Adailsom, aos Eng. João Tan e Marlon, a Fernando Dias, Cínara, Laís.
- As pessoas do ISA com as quais tive uma óptima convivência, em especial as meninas da ADISA pelo óptimo tratamento que recebi durante todo tempo.
- A minha prima Silvana, o seu esposo Clovis e as suas filhas Larissa e Lis Nara.
- A todos os colegas de Mestrado e Doutorado do Brasil e de outros países que tive a grata oportunidade de conhecê-los na residência do ISA
- A Portugal e todos os Portugueses pelo acolhimento durante este período que lá estive.
- As minhas amigas Patrícia, Zeza, Adriana e também aos colegas do Greenpeace.
- Ao Coordenador do curso de Biologia da Unijorge, Ednaldo e todos os professores.
- Aos meus amigos do Ténis em Portugal, Manuel, Chico, Antonio, Gaulter.

De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda, um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte, da procura um encontro.

Fernando Pessoa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica de estuários a nível mundial 7

Figura 2 – Mapa do estuário do Tejo, sapais das Hortas e do Rosário 13

Figura 3 – Bancos de vasa intertidais do Sapal das Hortas 14

Figura 4 – Bancos de vasa intertidais do Sapal do Rosário 15

Figura 5 – *Scrobicularia plana* 17

Figura 6 - Foto do mesocosmo 18

Figura 7 – Desenho experimental do projecto 20

Figura 8 - Gráfico de determinação da matéria orgânica 22

Figura 9 - Composição de matéria orgânica no Sedimento inicial (A), *Pellets* (B) e Sedimento-controlo (C) 26

Figura 10 - Gráfico de distribuição de partículas (%) das amostras de sedimento e dos *pellets* 28

Figura 11 - Gráfico comparativo de PSD entre as amostras de sedimento e *pellets* no mesmo intervalo 29

Figura 12 - Acumulação de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn no sedimento inicial (A), *pellets* (B) e sedimento controlo (C). 30

Figura 13 - Ordenação multidimensional não-métrica (nMDS) das amostras de sedimento onde as associações químicas de metais foram determinadas: ○ - sedimento inicial; ● - *pellets*;△ - sedimento controlo 31

Figura 14 - Associações químicas de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn no sedimento inicial (A), *pellets* (B) e sedimento-controlo (C). Os valores sobre as barras representam a soma das quatro fracções em $\mu g.g^{-1}$ (peso seco). 34

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Valores de p para análise de correlação de Pearson entre a concentração de metais pesados em cada fracção do sedimento e teor de carbono orgânico das amostras; n.d. - abaixo do limite de detecção 27

Tabela II – Valores do potencial redox (Eh), pH, salinidade e temperatura registados durante a experiência 32

Tabela III – Resultados das comparações a posteriori para a acumulação de metais nas diferentes fracções do sedimento entre os três grupos: sedimento inicial (A), pellets (B) e sedimento controlo (C). Símbolos diferentes (○,●) representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p<0.05$) 36

Tabela IV – Concentração total média dos metais nas amostras de sedimento inicial (A), pellets (B) e controlo (C) (µg.g-1, peso seco) 37

SIGLAS E ACRÓNIMOS

Eh – (Potencial redox) potencial de um eléctrodo inerte submerso numa solução onde se verifica o fenómeno de oxi-redução medida em relação ao eléctrodo de referência.

ICNB – (Instituto de Conservação da Natureza e Biodiversidade) órgão do governo de Portugal que tem como objectivo acompanhar e assegurar a execução das políticas de conservação da natureza e da biodiversidade e a gestão das áreas protegidas, visando a valorização e o reconhecimento público do património natural.

ICP-MS – (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) sigla em inglês para a técnica utilizada na quantificação de metais pesados.

MO / OM – matéria orgânica.

nMDS (non-metric Multidimensional scaling), é um conjunto de técnicas estatísticas relacionadas utilizado na visualização de informação para explorar semelhanças ou diferenças nos dados.

MPs – Metais Pesados

pH – potencial hidrogénioiónico, é um índice que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer.

PSD – (Particle Size Distribution) análise de distribuição de tamanho de partículas usada para classificar o tamanho de partículas do sedimento.

RPM – Rotações por minuto

SC – Amostra de controlo

SI – Sedimento Inicial

TGA – (Termogravimetric Analysis) técnica utilizada na determinação do teor de matéria orgânica das amostras.

RESUMO

Este trabalho consistiu em avaliar a influência dos moluscos bivalves na especiação de metais pesados (MPs) (Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Cr) em sedimento estuarino. Neste estudo foi utilizado o molusco bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778), uma espécie bentónica predominantemente filtradora, que se distribui por toda costa atlântica e Sul da Europa, e constitui um recurso haliêutico com alguma importância em Portugal. Estudos têm demonstrado que *a S. plana* é um bom bioindicador, razão pela qual tem sido muito utilizada nos programas de biomonitorização, principalmente quando se pretende investigar a presença de MPs em substrato estuarino. Os sapais escolhidos para a recolha dos animais e sedimentos situam-se no estuário do Tejo: o sapal das Hortas (Alcochete), considerado de baixo nível de contaminação por MPs e onde foram recolhidos os animais; e o sapal do Rosário (Moita), seleccionado pelas suas características e considerável pressão antropogénica, contendo níveis elevados de MPs, e onde foram recolhidas as amostras de sedimento. Esta experiência decorreu num mesocosmos em ambiente laboratorial, tendo sido monitorizados os parâmetros abióticos considerados relevantes para o sucesso do ensaio. Ao todo foram utilizados 420 espécimes adultos da *S. plana* e 40 litros de sedimento, ambos previamente preparados. Os animais foram mantidos em tanques com água salobra artificial e sedimento estuarino, aí permanecendo por 48h, tempo necessário para se alimentarem, sendo depois colocados em tanques apenas com água salobra artificial, para permitir a libertação e recolha dos *pellets* fecais. Após a recolha, amostras dos *pellets,* do sedimento inicial (SI) e sedimento controlo (SC) de cada tanque foram centrifugadas, liofilizadas e armazenadas a 4°C. No processo de extracção sequencial, foi utilizado o procedimento descrito por Tessier *et al.* (1979) e modificado posteriormente por Hullebush *et al.* (2005). A determinação dos MPs foi feita através de espectrometria de massa com indução de plasma (ICP-MS). Foi determinado o teor de matéria orgânica (MO) por análise termogravimétrica (TGA) e a distribuição de

partículas (PSD) pela técnica de foto-sedimentação (HORIBA). Neste trabalho foi avaliada a alteração na especiação química dos MPs induzida pela acção da *S. plana* através da comparação da concentração dos MPs nas diferentes fracções definidas operacionalmente, no SI, nos *pellets* e no SC. Nos resultados, o teor de MO variou entre 7.5% e 9.30%, os valores maiores ocorreram nos *pellets,* mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (p>0.05.), tal como não foi significativa a correlação entre a MO e as a concentração de MPs nas várias fracções. Os *pellets* apresentaram maior concentração de Cd, Cu, Pb e Zn, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A maioria dos MPs está ligada principalmente à fracção residual do sedimento. O teor de MPs nas amostras ocorreu na seguinte ordem: fracção residual > fracção ligada ao complexo MO e sulfuretos > fracção ligada aos carbonatos > fracção de troca. Na fracção de troca as diferenças não foram significativas para a maioria dos metais, excepto para o Cu e Zn entre o SC e os outros dois grupos de amostras; nesta fracção houve aumento de três (Cu) a dezassete vezes (Zn) nos *pellets* em relação ao SI e SC. Na fracção ligada aos carbonatos houve diferenças entre os *pellets* e SC, SI e o SC para o Cd, o Co, o Cu e o Pb; o Cd foi cerca de dez vezes superior nos *pellets*; o Ni apresentou diferenças significativas entre os *pellets* e o SI e o SC. Para o Zn houve diferenças significativas entre os *pellets* e o SI. Na fracção ligada à MO e sulfuretos houve diferenças entre o SI e os *pellets* para o Co, Ni e Zn, e para Cd e Cu entre os *pellets* e SC. Na fracção residual, o Cd, Cu, Pb e Zn apresentaram diferenças entre os *pellets* e SC. Os resultados obtidos evidenciaram a importância da S. plana na biodisponibilização de determinados elementos, principalmente o Ni, não parecendo ter a mesma relevância no caso do Co, Cr e Pb.

Palavras-chave: *Scrobicularia plana;* metais pesados; sedimentos estuarinos; bioindicador, especiação química; estuário do Tejo, Portugal.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of bivalve molluscs in the speciation of heavy metals, namely cobalt (Co), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), cadmium (Cd), lead (Pb) and chrome (Cr) in estuarine sediment. For this study we used the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778), a predominantly benthic filter-feeding species. It is geographically distributed throughout the Atlantic coast and southern part of Europe and constitutes a fishery resource of some importance in Portugal. Research has shown that *Scrobicularia plana* is a good bio-indicator, reason for which it has been widely used in biomonitoring programs, especially to investigate the presence of heavy metals in estuarine substrate. The salt marshes chosen to collect the specimens and sediments used in the experiment are located in the Tagus estuary: Hortas saltmarsh (Alcochete), considered a place with low-level of heavy metals contamination and where the animals were collected, and Rosário saltmarsh (Moita), presenting high levels of heavy metals contamination and where the sediment samples were collected. This experience took place in mesocosm environment in the laboratory and environmental conditions monitored. Altogether 420 adult specimens of *Scrobicularia plana* and 40 liters of sediment were used, both previously treated. The animals were placed into tanks with artificial brackish water and estuarine sediment and remained there for 48 hours, which was considered to be enough time for feeding to occur; after that period the animals were placed in tanks with artificial brackish water for elimination and collection of fecal pellets. After collection, the pellets and sediment samples from each tank were centrifuged, freeze dried and stored at 4°C. In the sequential extraction procedure, we used the method described by Tessier *et al*. (1979) and later modified by Hullebusch *et al.* (2005). Mass spectrometry with induced coupled plasma (ICP-MS) was used to determine the heavy metals.

The content of organic matter (OM) was determined by Thermogravimetric Analysis (TGA), and particle size distribution (PSD) was also determined using the of photo-

sedimentation technique by HORIBA. The change in chemical speciation of heavy metals induced by the action of *Scrobicularia plana* was assessed by comparing the concentration of heavy metals in different fractions of the initial sediment, of pellets and control sediment. The relationship between the concentration of heavy metals and organic matter (OM) was also studied. The OM content ranged between 7.5% and 9.30%, the higher values occurred in the *pellets,* but the differences were not statistically significant ($p>0.05$) nor was a significant correlation between OM and heavy metal fractions in all samples.

The pellets had higher concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn, however, this difference between groups was not statistically significant, the concentration of heavy metals in the pellets differ from other samples for Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. Most heavy metals are primarily bonded to residual fraction. The content of heavy metals in the fractions occurred in the following order: residual fraction> organic matter and sulfide complex > carbonates fraction > exchange fraction. In the exchangeable fraction the differences were generally not significant, except for Cu and Zn, where differences were found between initial sediment and the other two groups of samples; metals in this fraction increased by three times (Cu) to 17 times (Zn) in the pellets when compared to the initial and control sediment. In the fraction bound to carbonates differences were found between the pellets and control, and the control and the initial sediment for Cd, Co, Cu and Pb; Cd was about ten times higher in pellets; Ni presented differences between the pellets and the initial and control sediments. For Zn there were significant differences between the pellets and initial sediment. In the fraction bound to organic matter and sulfides there were differences between the initial sediment and the pellets for Co, Ni, Zn and Cd and Cu between the pellets and control. In the residual fraction, Cd, Cu, Pb and Zn showed differences between the pellets and control. The results obtained in this work have evidenced the importance of S. plana in the bioavailability of certain elements, particularly Ni; in the case of Co, Cr and Pb this species does not seem to affect the availability to the biota.

Keywords: Scrobicularia plana, heavy metals, estuarine sediment, bioindicators, chemical speciation, Tagus estuary, Portugal.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Pritchard (1967), um estuário é um corpo de água costeiro, semi-fechado, que possui uma ligação livre como o mar e que no seu interior a água se diluem de forma mensurável com a água doce proveniente da drenagem terrestre. No estuário podem definir-se diferentes zonas em relação ao nível de salinidade: zona limnética (<0,5), oligohalina (0,5 – 5), mesohalina (5 – 18), polihalina (18 -30) e euhalina (30 – 40). Os ecossistemas estuarinos estão sujeitos a níveis muito elevados de contaminação devido à sua localização que, sendo privilegiada, está na origem das elevadas pressões antropogénicas que sobre eles se abatem. É neste contexto que se enquadra a contaminação dos sedimentos por metais pesados.

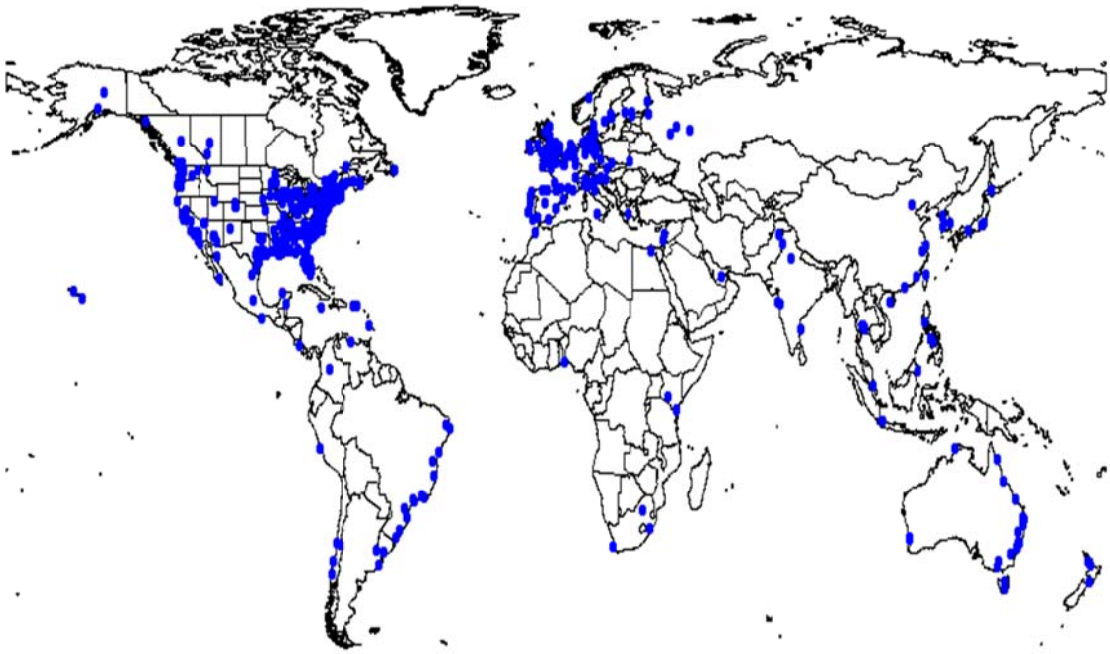

Figura 1 – Distribuição geográfica de estuários a nível mundial.

Os sedimentos constituem um reservatório natural com concentrações vestigiais de metais pesados, que ocorrem nos ambientes aquáticos por processos naturais (*e.g.* intemperismo). Porém os níveis de contaminação são às vezes potenciados pelo efeito das actividades antropogénicas. Os metais depositados nos sedimentos podem passar para a teia trófica estuarina ao serem incorporados pelos organismos de forma

directa, como é o caso de alguns organismos bentónicos, ou indirecta, através de relações tróficas. A incorporação dos metais pesados nos organismos pode produzir efeitos adversos se a concentração desses elementos atingirem níveis que representem toxicidade (Long *et al*. 1995). Os metais vestigiais estão presentes em diferentes formas químicas, e a sua biodisponibilidade para diferentes organismos aquáticos é fortemente dependente destas formas (Ružić, 1996). Para além disso, dependendo da concentração e do grau de complexação, o metal pode limitar o crescimento ou ser tóxico para organismos vivos (Meylan *et al.*, 2004).

A contaminação por metais pesados e organometais nos estuários e águas costeiras tem origem principalmente nas actividades antropogénicas, e tem causado grandes preocupações aos investigadores, administradores e decisores políticos (Mikac *et al.*, 1996). O processo de acumulação de contaminantes nos organismos aquáticos poderá contribuir em parte para bioacumulação e de certa forma produzirá efeitos negativos sobre o biota (Byrne & O'Halloran, 2001). A relação entre a acumulação de metais pesados nos sedimentos e o comportamento trófico dos organismos bentónicos é um importante factor que afecta a biodisponibilidade de diferentes metais no ambiente aquático (Monperrus *et al*, 2007).

A importância dos organismos bentónicos na dinâmica dos metais através dos respectivos dejectos depositados na superfície do sedimento é vista pela comunidade científica com alguma preocupação, tendo sido feitos vários trabalhos focados na acção *pellets* fecais (daqui em diante designados *pellets*) e sobre o processo de transporte daqueles poluentes para o fundo do mar. (Fowler, 1982). Para alguns organismos os dejectos são o principal meio de eliminação de metais pesados (Small & Fowler 1973).

Existem poucas informações disponíveis sobre os metais vestigiais contidos no material fecal dos invertebrados bentónicos. As partículas filtradas pelos filtradores bentónicos são depositadas nos sedimentos estuarinos através dos *pellets* e das pseudo-fezes (pseudo-fezes são grupos de finas partículas que são processadas pelos

bivalves e não ingeridas, são envolvidas pelo muco, mantidas dentro da cavidade do manto, e depois expelidas pelo sifão inalante ou pela margem ventral do manto (Berg *et al*., 1996). Este processo, conhecido como biodeposição, adiciona novo material ao sedimento e pode ser um importante caminho para a deposição de quantidades vestigiais de metais neste ambiente.

Estudos realizados nos *pellets* de invertebrados bentónicos revelaram a sua influência na concentração de matéria orgânica, e a geração de nutrientes durante a decomposição (Brown, 1986), demonstrando a possibilidade de os *pellets* influenciarem significativamente o ciclo biogeoquímico dos elementos vestigiais nos ecossistemas estuarinos. Muitos estudos têm demonstrado que a concentração de metais pesados no sedimento está relacionada com o tamanho das partículas e com a concentração de matéria orgânica no sedimento (Förstner, 1979, Thorne & Nickless, 1981), e que tanto os animais que se alimentam da matéria orgânica em suspensão, como os que retiram os seus alimentos de uma faixa restrita de tamanho de partículas do sedimento estão expostos a este tipo de contaminação. É importante comparar as concentrações dos metais encontrados nos *pellets* com o tamanho das partículas e a composição de carbono orgânico, pois são dados essenciais para investigar a influência do tamanho das partículas na alimentação e a concentração de metais nos *pellets* excretados pelos animais bentónicos. Um dos objectivos de estudar o ciclo biogeoquímico dos metais pesados é desenvolver meios de compreender o impacto biológico destes contaminantes com base nas suas concentrações no ambiente, e para isto é necessário compreender o comportamento biológico e geoquímico destes metais.

Quando um metal é introduzido no ecossistema aquático é imediatamente distribuído entre materiais particulados e soluções. A concentração das partículas (sedimento ou partículas em suspensão) ligadas ao processo de sedimentação e a dimensão das partículas do sedimento reflectem a combinação física e processos

biológicos (*e.g.* bioturbação) (Snelgrove & Butman, 1994, Aller & Aller, 1998, Murray *et al.*, 2002, Meysman *et al.*, 2006). Desta forma, os processos físicos e biológicos afectam as comunidades macrozoobentónicas. De modo que a relação entre sedimento e os organismos é considerada um caminho bastante conveniente para se estudar a sustentabilidade do habitat (Sanders, 1958).

Os bivalves que se alimentam de material particulado em suspensão obtêm os seus alimentos a partir da coluna de água, enquanto os que se alimentam de matéria depositada têm como fonte de alimento a matéria orgânica presente no sedimento. Estes alimentos são oriundos sobretudo da produção primária e do material particulado depositado da coluna de água, que pode ser fitoplâncton, biodepósitos, e/ou detritos (Navarro & Thompson, 1997).

Os moluscos bivalves são capazes de acumular altas concentrações de metais tóxicos no seu organismo sem evidenciar nenhum efeito adverso (Mouneyrac *et al.,* 1998). Nas últimas décadas, os efeitos decorrentes da absorção de metais pelos bivalves têm sido investigados intensivamente. Estes estudos abrangem a dimensão e o sexo dos bivalves (Cossa *et al.*, 1979), as variações de salinidade (Phillips, 1976), os compostos orgânicos dissolvidos (Zamuda *et al.,* 1985), a concentração de metais dissolvidos e especiação destes metais (Cobelo-García *et al.*, 2003), entre outros. Os moluscos bivalves são compostos por um número de sistemas sub-celulares importantes na acumulação, regulação e imobilização dos metais essenciais e não essenciais (Langston *et al.*, 1998).

A natureza geoquímica dos sedimentos, a associação metal-sedimento e a distribuição relativa dos metais na água ligados ao sedimento, podem ter uma influência considerável no destino final da biodisponibilidade dos metais nos organismos aquáticos (Luoma & Bryan, 1982, Di Toro *et al.*, 1990, Lee & Luoma, 1998). A transferência dos metais do sedimento para os organismos bentónicos pode afectar o comportamento dos animais, nomeadamente o comportamento trófico, hábitos de vida, ciclo reprodutivo, taxa de crescimento e tamanho (Cain & Luoma

1990, Warren *et al.*, 1998). Também outros animais que fazem parte da teia trófica podem sofrer impactos, dependo dos níveis de contaminação existente nestas fontes de alimentos. A presença de metais pesados nos moluscos, mesmo em quantidades vestigiais, representa um risco para a teia trófica, tanto para os indivíduos que se alimentam directamente destes animais quanto indirectamente, pois estes têm muita facilidade em reter substâncias tóxicas nos seus organismos. Pela forma como se relacionam com o habitat, principalmente a forma como retiram os alimentos do meio, os moluscos bentónicos estão directamente expostos à contaminação por metais. Na sua alimentação, o Homem pode ficar exposto directamente à contaminação presente nestes animais através do seu consumo, que dependendo dos níveis de contaminação e do tipo de metal podem trazer consequências irreversíveis para sua saúde.

1.1. Objectivos

1.1.1. Objectivo Geral

O objectivo principal deste trabalho foi avaliar a possível alteração na especiação de metais pesados em sedimentos de sapal, após passagem pelo tracto digestivo do molusco bivalve *Scrobicularia plana*, utilizando para a experiência os *pellets* fecais desta espécie.

1.1.2. Objectivos Específicos

1. Verificar a diferença entre a concentração de metais pesados no sedimento estuarino e nos *pellets* de *Scrobicularia plana*;
2. Verificar a concentração de metais pesados nas diferentes fracções do sedimento estuarino e nos *pellets* de *Scrobicularia plana*;
3. Verificar a diferença no teor de matéria orgânica do sedimento e dos *pellets*;

4. Verificar a relação entre o teor de matéria orgânica e concentração de metais pesados no sedimento e nos *pellets*.

2 LOCAL DE ESTUDO

2.1 Estuário do Tejo

O local escolhido como suporte do trabalho foi o estuário do Rio Tejo (Fig. 2). O estuário do Tejo (38°44'N, 9°08'W) está entre os maiores estuários da Europa ocidental, com aproximadamente 320 km², e apresenta uma grande diversidade de habitats, como salinas, sapais e vasas. Encontram-se neste estuário importantes locais de reprodução, nidificação, alimento, repouso e abrigo para várias espécies. Este estuário contém uma das mais importantes zonas húmidas da Europa, sendo considerado um santuário para aves, peixes, moluscos e crustáceos.

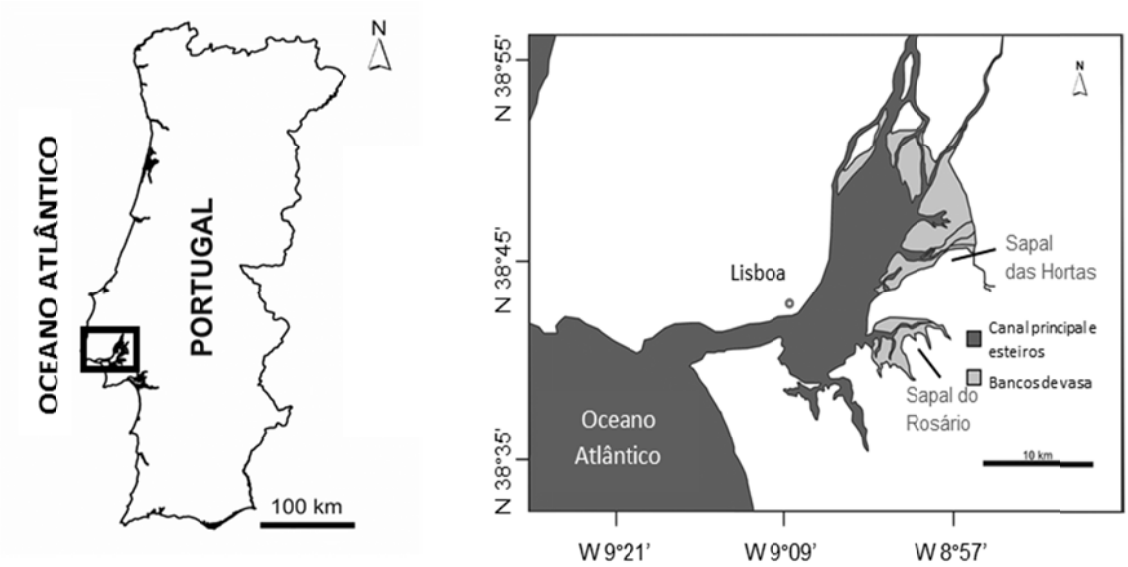

Figura 2 – Mapa do estuário do Tejo, sapais das Hortas e do Rosário.

2.2 Definição de sapal

Os sapais são ecossistemas intertidais que constituem uma interface entre o meio terrestre e o meio marinho (um estuário ou o mar), possuindo elementos e atributos de ambas as comunidades, terrestre e aquática (Wiegert *et al*., 1981). Em geral, os sapais encontram-se distribuídos nas médias e altas latitudes de todo o planeta, sendo substituídos por mangais nas regiões tropicais (Boaden & Seed, 1985). Ocorrem em zonas adjacentes a estuários, baías ou rias, em áreas protegidas da

acção directa das vagas e das correntes. Formam-se na zona intertidal pela deposição sucessiva de sedimentos finos provenientes das marés que periodicamente os inundam (Wiegert & Freeman, 1990). A vegetação não somente é um elemento caracterizante dos sapais, como também intervém activamente na sua formação. Actua como uma armadilha de sedimentos, permitindo a sua deposição, e protege da erosão (Packham & Willis, 1997).

2.3 Sapal das Hortas (Alcochete)

Neste sapal, localizado no conselho de Alcochete (N38º45'24.79" e W8º57'59.59"), foi feita a recolha dos animais para o trabalho experimental. O sapal das Hortas (Fig. 3) está inserido na Reserva na Natural do estuário do Tejo, que faz parte das áreas protegidas pelo ICNB. A razão da escolha deste ambiente para a colheita dos animais prendeu-se com o facto de este sapal apresentar baixos níveis de perturbações de origem antropogénica. De acordo com estudos feitos anteriormente neste local, verifica-se a existência de valores baixos de contaminação por metais pesados, justificando assim a nossa escolha.

Figura 3 – Bancos de vasa intertidais do Sapal das Hortas.

2.4 Sapal do Rosário (Moita)

O sedimento utilizado no trabalho experimental foi recolhido no sapal do Rosário ("N38°39'20.85" e W8°59'48.35"). A escolha do sapal do Rosário (Fig.4) como fornecedor do sedimento para a experiência relacionou-se com o facto de este ser um sapal que apresenta grandes perturbações de origem antropogénica. Neste sapal existe um pequeno porto onde ocorrem vários tipos de contaminações como consequência da actividade pesqueira e de actividades correlacionadas; recebe também efluentes domésticos, industriais e agrícolas. De acordo com estudos feitos anteriormente neste sapal verificou-se um nível elevado de contaminação por metais pesados. Com base nestes estudos e nos aspectos observados pode-se concluir que é um local que está sob grande impacto ambiental, justificando então escolha deste como local de colheita dos sedimentos, de forma a potenciar a observação de resultados.

Figura 4 – Bancos de vasa intertidais do Sapal do Rosário.

3 CASO DE ESTUDO

3.1. *Scrobicularia plana* – Ecologia

O molusco bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa 1778), a lambujinha, vive em buracos permanentes que podem atingir os 20 cm de profundidade, nos sedimentos intertidais com características polihalinas, que podem ser desde a lama a areia e às vezes cascalho (Verdelhos *et al.*, 2005). Embora obtenha parte do seu alimento através dos seus longos sifões filtrando as partículas da água quando a maré está cheia, a *S. plana* (Fig. 5) ingere essencialmente partículas que se depositam no sedimento (Hughes, 1969), principalmente nos períodos de maré baixa. Os seus sifões são por vezes predados por caranguejos, peixes e aves; contudo a regeneração dos sifões ocorre em poucas semanas. A reprodução ocorre normalmente no verão; as larvas são livres, com uma fase planctónica que dura 2 a 3 semanas até sofrerem metamorfose para a fase adulta. Esta espécie tem uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada desde a costa Atlântica até ao sudoeste de Inglaterra. (Tebble,1976) É uma espécie mais tolerante às variações de salinidade e temperatura do que a maioria dos bivalves estuarinos (Bryan & Hummerstone, 1977). A sua longevidade pode chegar a mais de dez anos, geralmente atingindo um comprimento de 4-5 cm, e a sua taxa de crescimento pode ser estimada a partir dos anéis da concha (Hughes, 1970).

Figura 5 - *Scrobicularia plana.*

Esta espécie tem várias características que a tornam muito apelativa como objecto de estudo, principalmente pela sua resistência às variações da salinidade e temperatura. Por ser muito resiliente a alterações ambientais tem sido muito usada tanto em programas de biomonitorização como em testes de toxicidade (Byrne & O'Halloran, 2001; García-Luque *et al.,* 2004). Por todas estas características este molusco bivalve tem sido largamente utilizado em vários trabalhos, principalmente quando se pretende investigar bioacumulação de substâncias tóxicas, como os metais pesados. É ainda uma espécie de alguma importância económica em Portugal e em todo o litoral mediterrânico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Construção do mesocosmo

Para a realização deste projecto foi necessário montar uma estrutura em laboratório utilizando uma réplica mais próxima possível do habitat de *S. plana*, composto pelos seguintes elementos: um tanque em vidro com capacidade total de 800L, 7 pequenos tanques rectangulares com capacidade de 30L cada (Fig. 6). No tanque de maior capacidade foi colocada água até uma altura de 12 cm, onde foi instalado sistema de refrigeração e circulação de água, com objectivo de manter a temperatura constante (17ºC +/- 1.0°C). Foi instalado também um sistema de iluminação artificial para simular a alternância dia/noite do habitat (12D:12N). Estas condições ambientais foram definidas a partir de informações encontradas na literatura e das simulações feitas durante a fase do teste experimental.

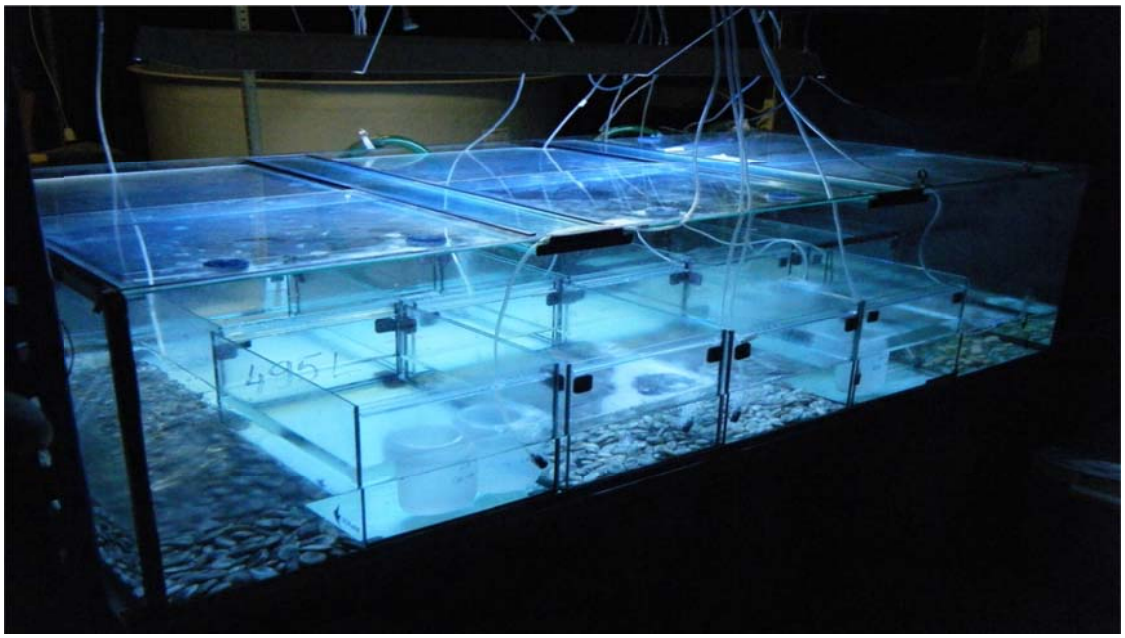

Figura 6 – Foto do mesocosmo.

4.2. Plano de amostragem

Este trabalho consistiu em avaliar em ambiente de mesocosmo a possível alteração na especiação de metais pesados presentes no sedimento de sapal, após passagem pelo tracto digestivo do molusco bivalve *S. plana*. Este trabalho foi realizado a partir da hipótese que os espécimenes adultos de *S. plana,* através do seu processo de alimentação e excreção, poderão influenciar uma possível alteração na especiação de metais pesados nos sedimentos estuarinos. Para testar esta hipótese foi avaliado o teor de metais pesados contido nos *pellets* excretados pelos animais, comparando com o sedimento do início e do final da experiência (sedimento controlo).

4.3. Avaliação preliminar do projecto

Foi montado um dispositivo experimental com o objectivo de avaliar e definir as condições a aplicar no projecto final (Fig. 7). Esta fase serviu também para testar a eficiência do mesocosmo em reproduzir em laboratório as condições próximas às existentes no habitat de *S. plana*. Nesta experiência teste foram utilizados 60 animais num tanque com sedimento e água preparada artificialmente com salinidade de 24 PSU e condições ambientais equivalentes às encontradas no habitat de origem.

A partir do sucesso obtido no teste, e promovendo algumas correcções em função das dimensões da experiência, foi possível definir as condições para a configuração final do trabalho.

4.4. Recolha e preparação do sedimento

Para o trabalho foi necessário um total de *c.* 40 L de sedimento que foi recolhido no Sapal do Rosário. As amostras foram recolhidas a partir da camada superior do sedimento (0.5 a 1 cm de profundidade). Após a recolha, e no mesmo dia, as amostras de sedimentos foram passados por um crivo com malha de 250 µm, com o objectivo de remover macrofauna, detritos e areia grosseira. Após o processo de crivagem as amostras foram homogeneizadas e distribuídas em duas fases distintas

pelos aquários de 30L, até uma altura de cerca de 7cm; em seguida foi adicionada a água salobra preparada artificialmente até atingir 15 cm de altura. Os aquários foram condicionados durante 24h em condições controladas de temperatura, salinidade, luminosidade e oxigenação próximas das ambientais, para a posterior colação dos animais. O sedimento remanescente, utilizado na segunda fase da experiência, foi preservado a 4°C.

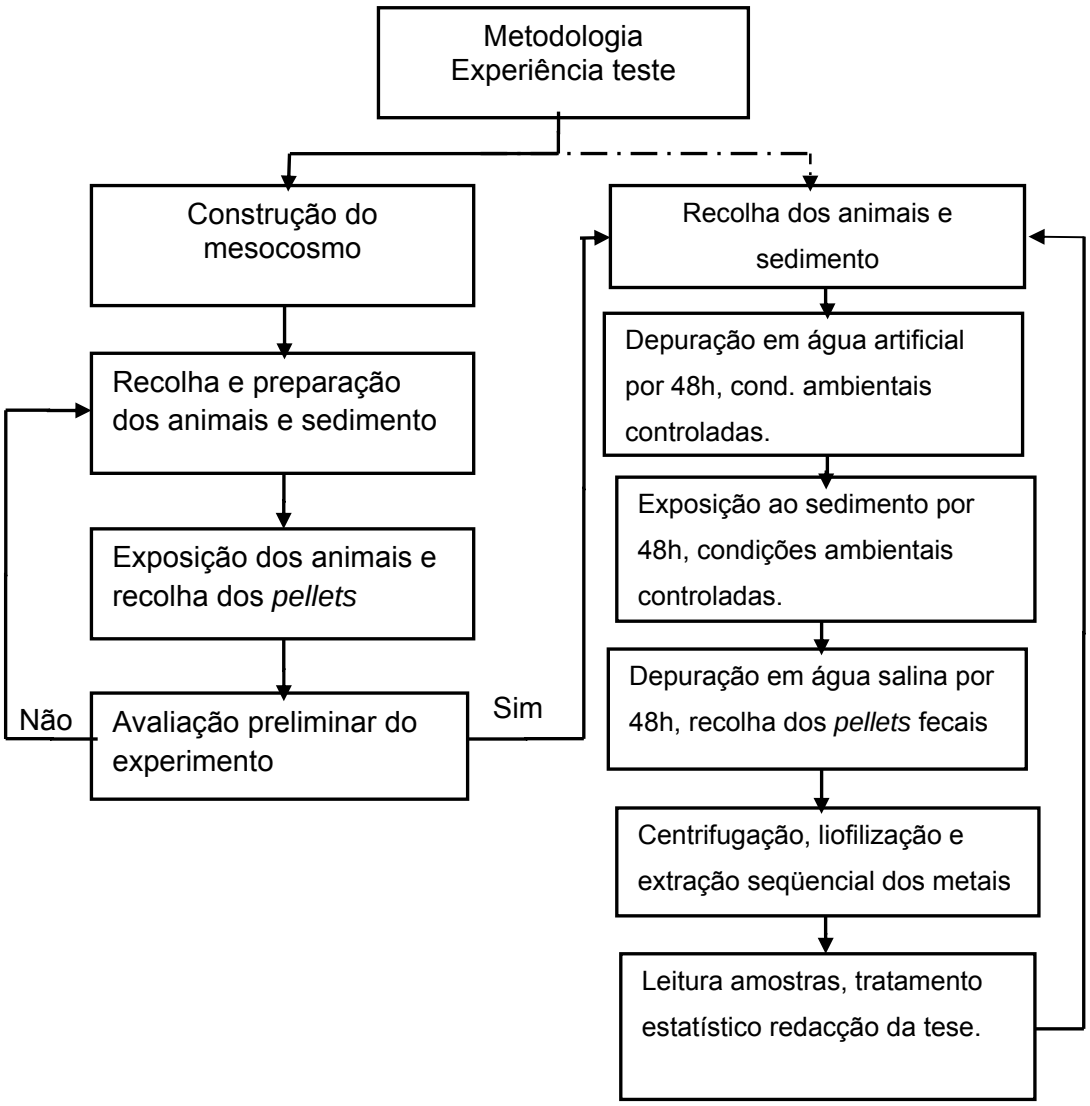

Figura 7 – Desenho experimental do projecto.

4.5. Recolha e preparação dos animais

Para a experiência foram utilizados 420 exemplares adultos de *S. plana*, recolhidos no Sapal das Hortas. Após a recolha, os animais foram colocados em água salobra preparada artificialmente durante 7 dias em condições controladas idênticas às ambientais (temperatura, salinidade, luminosidade e oxigenação), com o objectivo de eliminar o conteúdo residual existente nos respectivos tractos digestivos dos exemplares e aclimatá-los para a experiência. Após o período de depuração os animais foram distribuídos nos sete tanques previamente preparados com o sedimento, perfazendo um total de 60 animais por tanque.

4.6. Recolha dos *pellets*

Durante a experiência os animais ficaram nos tanques expostos ao sedimento durante 48h, tempo definido na fase de teste como sendo o necessário para os exemplares se alimentarem do sedimento. Após esse período os animais foram retirados e colocados em água preparada artificialmente por mais 48h, para eliminação do conteúdo do tubo digestivo. Após este período, e utilizando uma pipeta descartável de 5 ml, foram feitas as colheitas dos *pellets* e colocados em tubos de centrífuga de 10 ml. As amostras foram centrifugadas e armazenadas a 4ºC. No processo de recolha não foram consideradas as amostras de pseudo-fezes (de acordo com Berg *et al.* (1996), pseudo-fezes-são partículas que são levadas para dentro da cavidade do manto, processadas, mas não ingeridas, então, estas partículas são envolvidas com muco e ejectadas através do sifão inalante ou ao longo da margem ventral do manto).

O processo descrito no passo 4.6 deste capítulo foi repetido por mais uma vez utilizando os mesmos exemplares de *S. plana*, trocando apenas os sedimentos dos tanques. O objectivo de replicar a experiência foi aumentar a quantidade de amostra necessária aos testes. Para cada série do trabalho foram recolhidas amostras do sedimento de todos dos tanques no início e no final de cada experiência. Após as

recolhas dos *pellets* nas duas fases, as amostras foram liofilizadas e armazenadas para a posterior extracção de metais.

4.7. Quantificação de matéria orgânica (TGA)

Para determinar o teor de matéria orgânica foi utilizada a técnica Thermogravimetric Analysis (TGA). Esta técnica consiste na dissociação de massa orgânica com base em variações de temperatura. O sistema (TGA) é composto de um forno de alta precisão com aquecimento controlado até a temperatura de 1000ºC, uma micro-balança de alta precisão, em platina, resistente as altas temperaturas e que regista a perda de peso em relação à variação de temperatura.

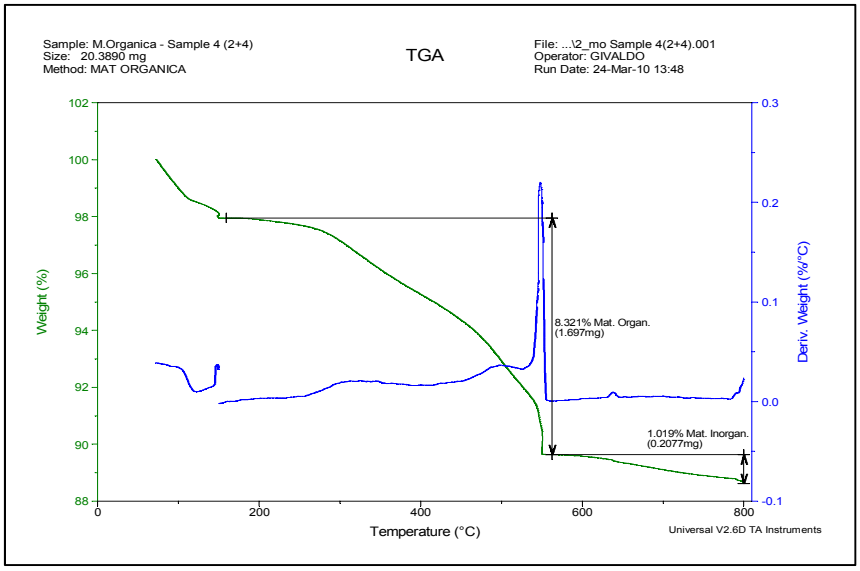

Figura 8 – Gráfico de determinação da matéria orgânica.

Este sistema é alimentado por um gás inerte (N_2), gás de purga, e um gás de combustão (O_2). Uma grande vantagem deste sistema é poder trabalhar com pequenas quantidades de amostra e mesmo assim permiti um elevado grau de precisão nos resultados. No processo de decomposição/quantificação da matéria orgânica, as amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até uma temperatura de 550°C, (Fig. 8) (ponto de cálculo da MO) em atmosfera de N_2 e uma taxa de aquecimento de 30°C/minuto para uma massa de aproximadamente 20 mg. Em

seguida a mesma amostra continuou sendo aquecida até 800°C em atmosfera de O_2, mantendo a mesma taxa de aquecimento (30°C/min.), temperatura final onde é calculado o teor de matéria inorgânica na amostra. Todas as amostras foram testadas em triplicado. Os cálculos da percentagem de carbono orgânico e inorgânico foram realizados utilizando um programa da TA Instruments que faz a interpolação do pico da dissociação da amostra na respectiva temperatura, tendo em consideração a massa total de amostra utilizada.

4.8. Análise de distribuição de partículas

Para a análise de distribuição de partículas nas amostras foi utilizado o equipamento Horiba CAPA-700 Particle Size Ditribution Analyzer e a técnica correspondente. Esta técnica é baseada no princípio da foto-sedimentação em fase líquida. A medição é feita usando o princípio de transmissão óptica, que combina a equação de sedimentação com a relação de proporcionalidade entre a absorvância e a concentração de partículas, ou seja, uma determinada partícula se tem um diâmetro (D) e uma densidade (ρ) dentro de uma solução de densidade (ρ_o), e um coeficiente de viscosidade (η_o) e, como tal, irá precipitar a uma velocidade constante de acordo com a lei do efeito gravitacional. Na prática, as partículas têm vários diâmetros, e a velocidade de sedimentação vai depender do tamanho da partícula. Partículas com diâmetros maiores (D1) precipitarão primeiro. O método de transmissão óptico mede o grau de sedimentação da partícula pela quantidade de luz transmitida pela solução, a intensidade da luz transmitida é absorvida pelo detector localizado do lado oposto da célula de leitura. A solução utilizada neste teste foi glicerina em água a qual apresentou uma viscosidade de 60.5 cP. As amostras foram homogeneizadas na solução de glicerina com ajuda de um banho de ultra-sons, durante 15 segundos e utilizando a potência mínima para não quebrar as partículas; como branco foi utilizado a mesma solução de glicerina em água.

Com objectivo de abranger uma distribuição com a maior amplitude possível as análises foram feitas em duas etapas, envolvendo intervalos distintos (120µm a 4µm e 4µm a 0.4µm).

4.9. Extracção sequencial dos metais

Antes de iniciar a extracção todo o material de laboratório envolvido no processo foi devidamente descontaminado, primeiro numa solução de HNO_3 a 10% durante 24h, e depois numa solução de HCl a 10% por 48h, e lavado em seguida por três vezes com água desionizada para remover qualquer resíduo de ácido presente. Para a extracção sequencial foi utilizando o procedimento descrito por Tessier *et al.* (1979) e modificado por Hullebusch *et al.* (2005). O método de extracção foi utilizado para determinar a especiação química dos metais pesados (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn) tanto nas amostras de sedimento como nos *pellets* e consiste na extracção sequencial de fracções definidas operacionalmente a partir de 1 g de amostra, conforme se explica a seguir:

1º passo: extracção da fracção de troca com 10 ml de solução de acetato de amónia (ph 7) 1M; agita-se durante 1h a uma rotação de 150 rpm e à temperatura ambiente e centrifuga-se durante 10 minutos a 4000 rpm; após a centrifugação o sobrenadante é recolhido para análise;

2º passo: fracção ligada a carbonatos. Adicionam-se 10 ml de uma solução 1M de ácido acético, agita-se durante 1h a uma rotação de 150 rpm e à temperatura ambiente e centrifuga-se durante 10 minutos a 4000 rpm; após a centrifugação o sobrenadante é recolhido para análise;

3º passo: fracção ligada à matéria orgânica e sulfuretos. Adicionam-se 5 ml de uma solução a 30% de H_2O_2 (pH 2, ajustado com NHO_3); agita-se durante 3h a 150 rpm e à temperatura de 35°C, centrifuga-se durante 10 minutos a 4000 rpm; após a centrifugação o sobrenadante é recolhido para análise;

4º passo, fracção residual ou litogénica – adicionam-se 10 ml de *Aqua Regia* (HNO_3:HCl 1:3, v/v) e submete-se a uma digestão de elevada pressão (em reactores de Teflon® fechados) durante 3h a 110°C; aguarda-se o retorno da solução à temperatura ambiente, filtra-se e perfaz-se o volume para 10ml com água ultra-pura (Milli-Q);

5º passo: extracção total, em bombas de Teflon; pesa-se 0.1 g da amostra, adicionam-se 2 ml de *Agua Regia* (HNO3/HCl 1:3 v/v), e submete-se a uma digestão de elevada pressão (em reactores de Teflon® fechados) durante 3h a 110°C; perfaz-se o volume conforme necessário até 10 ml com água Mili-Q.

Após a extracção as amostras foram armazenadas a 4ºC. As concentrações dos metais (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn) foram determinadas através de Espectrometria de Massa com indução de plasma acoplada (ICP-MS).

4.10. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas no programa STATISTICA 9.0 Analysis Pack (StatSoft, Inc., 2008). Foram utilizados os testes t-Student e Mann-Whitney para comparar os grupos de amostras envolvidas na análise para os dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente (Sokal & Rohlf, 1995; Zar, 1999). Foi também feita a análise de correlação entre os metais associados a cada fracção do sedimento e o teor de matéria orgânica de cada amostra, tendo sido utilizado o coeficiente de correlação de Pearson por se ter verificado o carácter paramétrico dos dados para esta análise.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da composição de matéria orgânica

O teor de matéria orgânica variou entre 7.5% e 9.30%, para todas as amostras avaliadas (sedimento inicial, *pellets* e sedimento controlo) (Fig. 9)**.** As amostras de *pellets* (B) e controlo (C) apresentaram concentrações mais elevadas de carbono orgânico em relação amostra de sedimento inicial, porém estas diferenças com relação ao sedimento inicial (A) não foram estatisticamente significativas ($p>0.05$). O valor médio mais elevado foi registado para os *pellets*, enquanto que o sedimento inicial foi que apresentou menor valor médio de carbono orgânico.

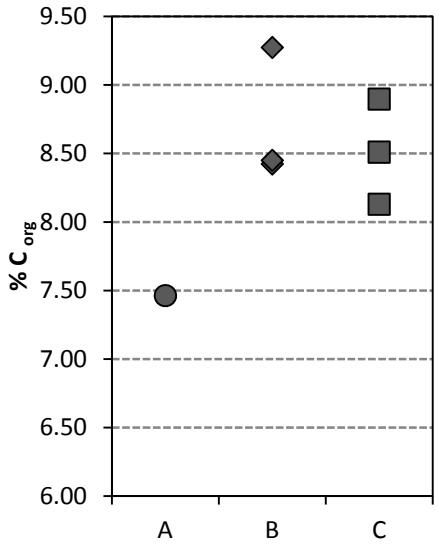

Figura 9: Composição de matéria orgânica no Sedimento inicial (A), Pellets (B) e Sedimento-controlo (C).

A análise de correlação de Pearson entre a acumulação de metais nas várias fracções do sedimento e dos *pellets* e o teor de carbono orgânico (Tab. I) não apresentou valores significativos para nenhuma das fracções das amostras comparadas.

Tabela I –Valores de p para análise de correlação de Pearson entre a concentração de metais pesados em cada fracção do sedimento e teor de carbono orgânico das amostras; n.d. - abaixo do limite de detecção.

Metal	Troca	Carbonatos	Mat. orgânica e sulfuretos	Residual
Cd	0.431	0.503	0.120	0.224
Co	0.081	0.717	0.366	0.266
Cr	0.921	0.903	0.653	0.160
Cu	0.435	0.444	0.733	0.288
Ni	0.205	0.324	0.293	0.261
Pb	0.405	0.665	n.d.	0.428
Zn	0.194	0.393	0.279	0.521

5.2 Análise de distribuição de partículas

A análise de distribuição de partículas (Fig.10) demonstrou comportamento bastante semelhante para as amostras do sedimento inicial e final quando considerando as partículas inferiores a 4µm. As amostras de *pellets* foram as que apresentaram distribuição mais uniforme entre 0.4µm e 4.0µm. As partículas de maior calibre (entre 40µm e 120µm) estão presentes em todas as amostras e com uma frequência bastante similar. Comparando a distribuição entre 4µm e 0.4µm para as três amostras (Fig. 11), verifica-se que houve uma redução significativa no tamanho médio das partículas presentes nos *pellets* quando comparada com as amostras de sedimento inicial e controlo. Em geral não se verificaram grandes diferenças entre as amostras. Observa-se que a distribuição de partículas de todas as amostras apresentou características multi-modais.

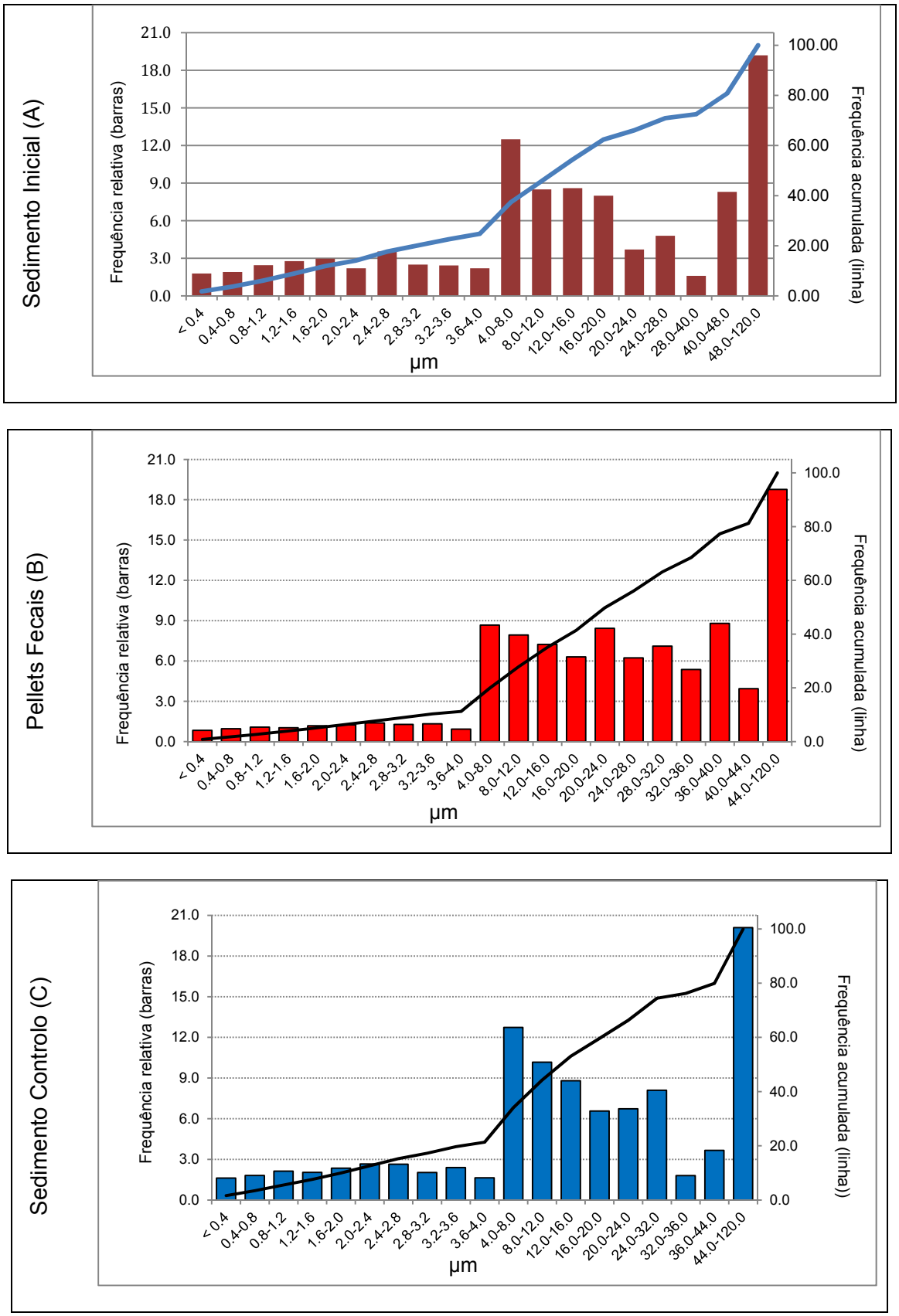

Figura 10: Gráfico de distribuição de partículas (%) das amostras de sedimento e dos *pellets*.

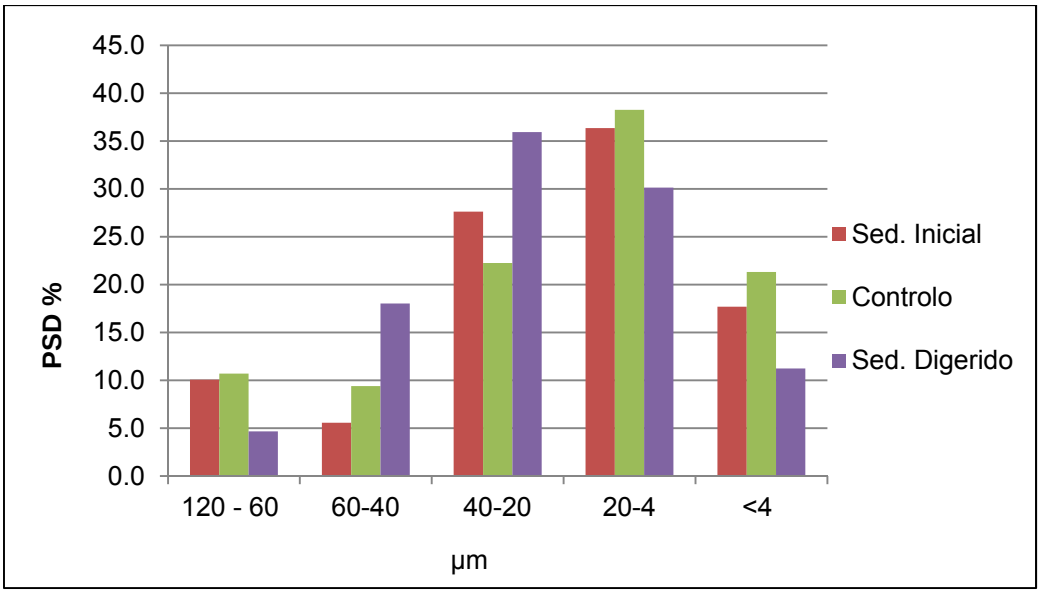

Figura 11: Gráfico comparativo de PSD entre as amostras de sedimento e pellets no mesmo intervalo.

5.3 Acumulação de metais

Os *pellets* de *Scrobicularia plana* apresentaram maior concentração de Cd, Cu, Pb e Zn quando comparados com o sedimento inicial e controlo, tendo-se verificado o inverso nos restantes elementos (Co, Cr e Ni) (Fig. 12). No entanto, esta diferença verificada entre os grupos não foi estatisticamente significativa.

5.4 Especiação de metais

A acumulação de metais encontrada nos *pellets* de *Scrobicularia plana* difere dos resultados obtidos para o sedimento inicial e sedimento controlo para o Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn, considerando todas as associações químicas simultaneamente na análise de ordenação muldimensional (nMDS) (Fig. 13). A associação química de Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn nas quatro fracções do sedimento usado nesta experiência estão demonstradas na Figura 14.

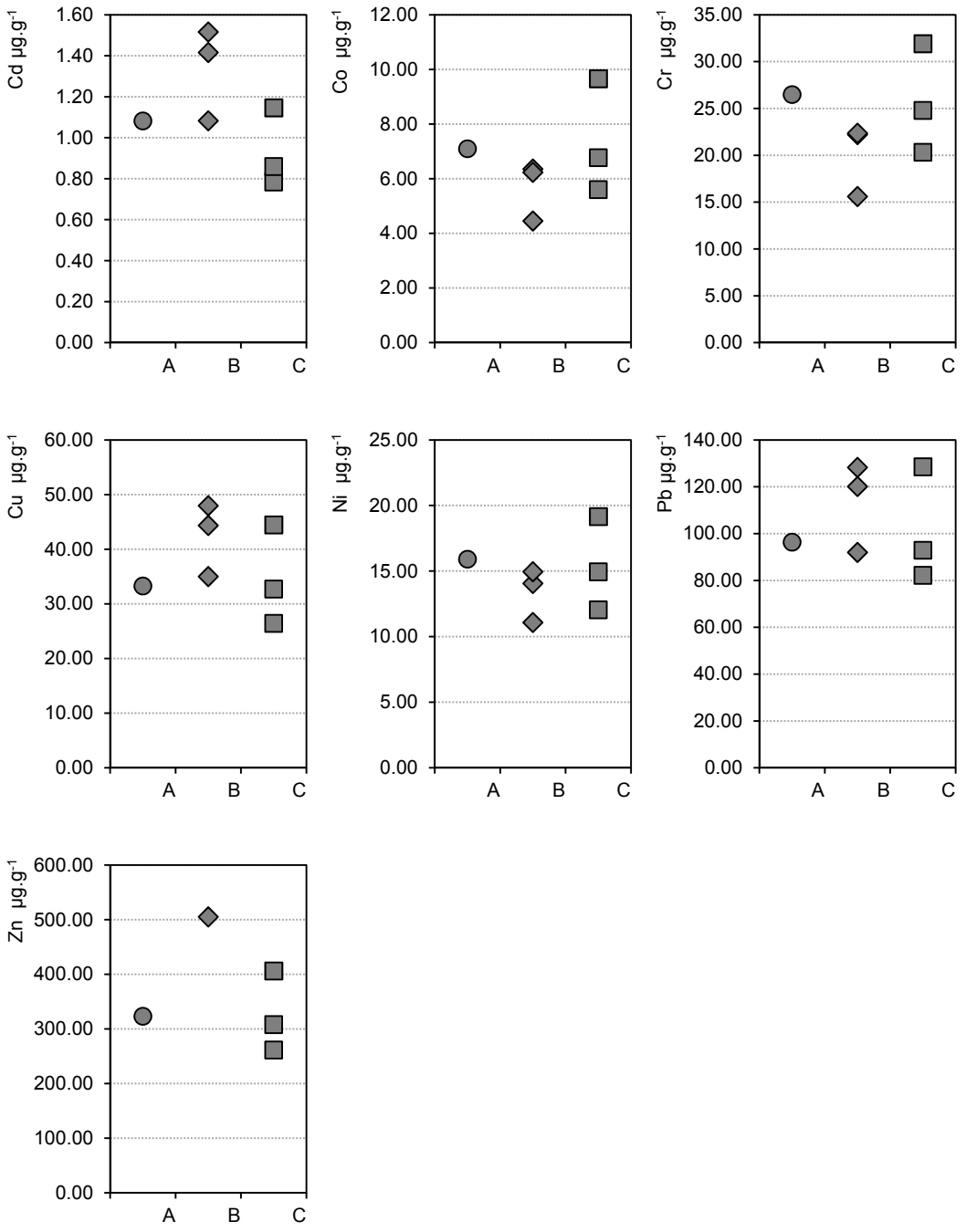

Figura 12 – Acumulação de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn no sedimento inicial (A), *pellets* (B) e sedimento controlo (C).

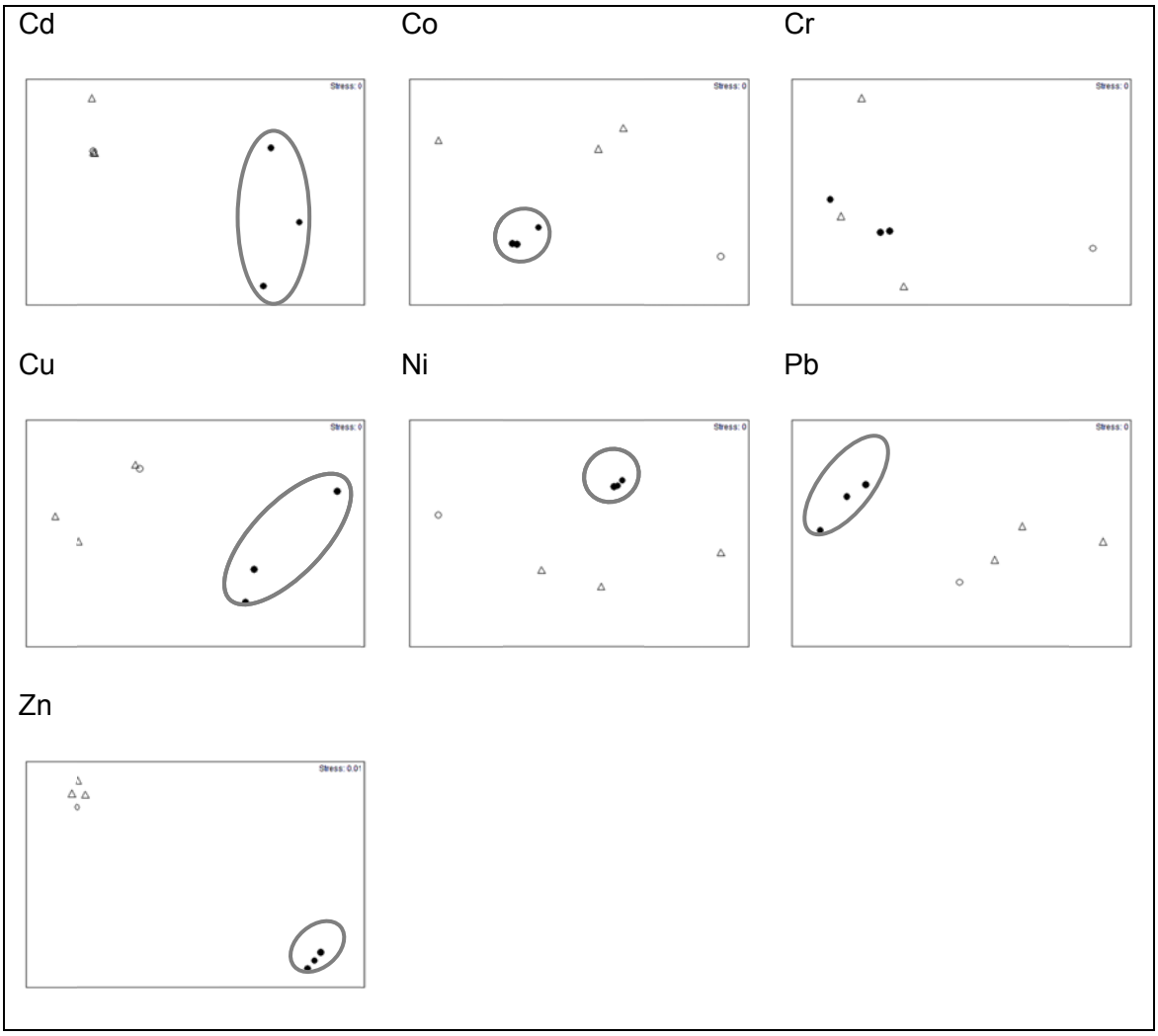

Figura 13 - Ordenação multidimensional não-métrica (nMDS) das amostras de sedimento onde as associações químicas de metais foram determinadas: ○ - sedimento inicial; ● - *pellets*; △ - sedimento controlo.

A maioria dos metais está ligada principalmente a fracção residual (Fig. 14). A percentagem de cada metal ligada às quatro fracções definidas operacionalmente seguiu a seguinte ordem: fracção residual > complexo matéria orgânica > carbonatos > fracção de troca, com pequenas excepções. Os valores do potencial redox e de pH foram praticamente constantes durante toda a experiência (Tab. II).

Tabela II - Valores do potencial redox (Eh), pH, salinidade e temperatura registados durante a experiência

Tanque	Data	Salinidade	Temperatura ºC	pH	E h
TQ (I)	30/out	28	18.6	7.48	211.5
	31/out	26	17.6	7.55	208.5
	02/nov	*	17	*	*
	05/nov	26	18.4	7.64	202.8
TQ (II)	30/out	28	17.8	7.48	207.4
	31/out	26	17.8	7.51	210.2
	02/nov	*	17.5	*	*
	05/nov	27	18.2	7.59	206.2
TQ (III)	30/out	28	17.5	7.43	211.9
	31/out	27	17.3	7.51	210.8
	02/nov	*	17.5	*	*
	05/nov	26	17.8	7.66	201.6
TQ (IV)	30/out	28	17.4	7.41	209.6
	31/out	26	17.4	7.45	214
	02/nov	*	17.4	*	*
	05/nov	28	18.3	7.61	204.8
TQ (V)	30/out	27	17	7.55	207.7
	31/out	25	17	7.61	205
	02/nov	*	17.6	*	*
	05/nov	28	18.1	7.76	205.2
TQ (VI)	30/out	28	17.3	7.53	209.6
	31/out	26	17.6	7.49	211.8
	02/nov	*	17.5	*	*
	05/nov	29	18.4	7.58	206.8
TQ (VII)	30/out	28	17.1	7.51	208.3
	31/out	25	17.3	7.5	211.8
	02/nov	*	17.4	*	*
	05/nov	27	18.5	7.58	206.2
Média		27.0	18.0	7.5	208.2
Std		1.14	1.82	0.08	3.27

*valores não disponíveis

Na fracção de troca não foram encontradas diferenças significativas ($p>0.05$) entre os *pellets* e o sedimento inicial para nenhum dos metais analisados (Tab. III)**.** No entanto, foram encontradas diferenças entre o sedimento controlo e os outros dois grupos para o Cu e o Zn ($p<0.05$), apesar dessas diferenças serem pouco evidentes ao analisar os respectivos gráficos.

No caso do Ni, os *pellets* e o controlo diferiram significativamente entre si ($p=0.015$) mas não do sedimento inicial ($p>0.05$). Convém referir que para estes três metais, a concentração localizada na fracção de troca revelou-se entre três (Cu) a 17 vezes superior (Zn) nos *pellets* em relação ao sedimento inicial e ao controlo, pelo que o baixo *n* utilizado deverá estar na origem dos resultados obtidos na análise estatística. Nos casos do Cd, Co e Pb não foram encontradas diferenças significativas entre grupos ($p>0.05$), e a ligação do Cr a esta fracção revelou-se abaixo dos limites de detecção do equipamento utilizado.

A análise dos resultados da fracção ligada aos carbonatos (Tab. III) evidenciou diferenças entre os *pellets* e o controlo, mas não entre *pellets* e sedimento inicial ou entre este último e o controlo, para o Cd ($p=0.002$), o Co ($p=0.028$), o Cu ($p=0.003$) e o Pb ($p=0.002$). Contudo, o Cd acumulado nesta fracção foi cerca de dez vezes superior nos *pellets* em relação aos outros dois grupos, pelo que seria expectável que as diferenças fossem também estatisticamente significativas entre *pellets* e sedimento inicial. Para o Zn foram encontradas diferenças entre os *pellets* e o sedimento inicial ($p=0.012$), mas não entre os *pellets* e o controlo ($p>0.05$), apesar da diferenças se encontrar na mesma ordem de grandeza; o Ni foi o único elemento a apresentar diferenças estatisticamente significativas entre os *pellets* e o sedimento inicial ($p=0.022$) e os *pellets* e o controlo ($p=0.001$), apresentando uma concentração nos *pellets* cerca de três vezes superior aos outros dois grupos. Por sua vez não foram encontradas diferenças entre os três grupos para o Cr ligado à fracção dos carbonatos.

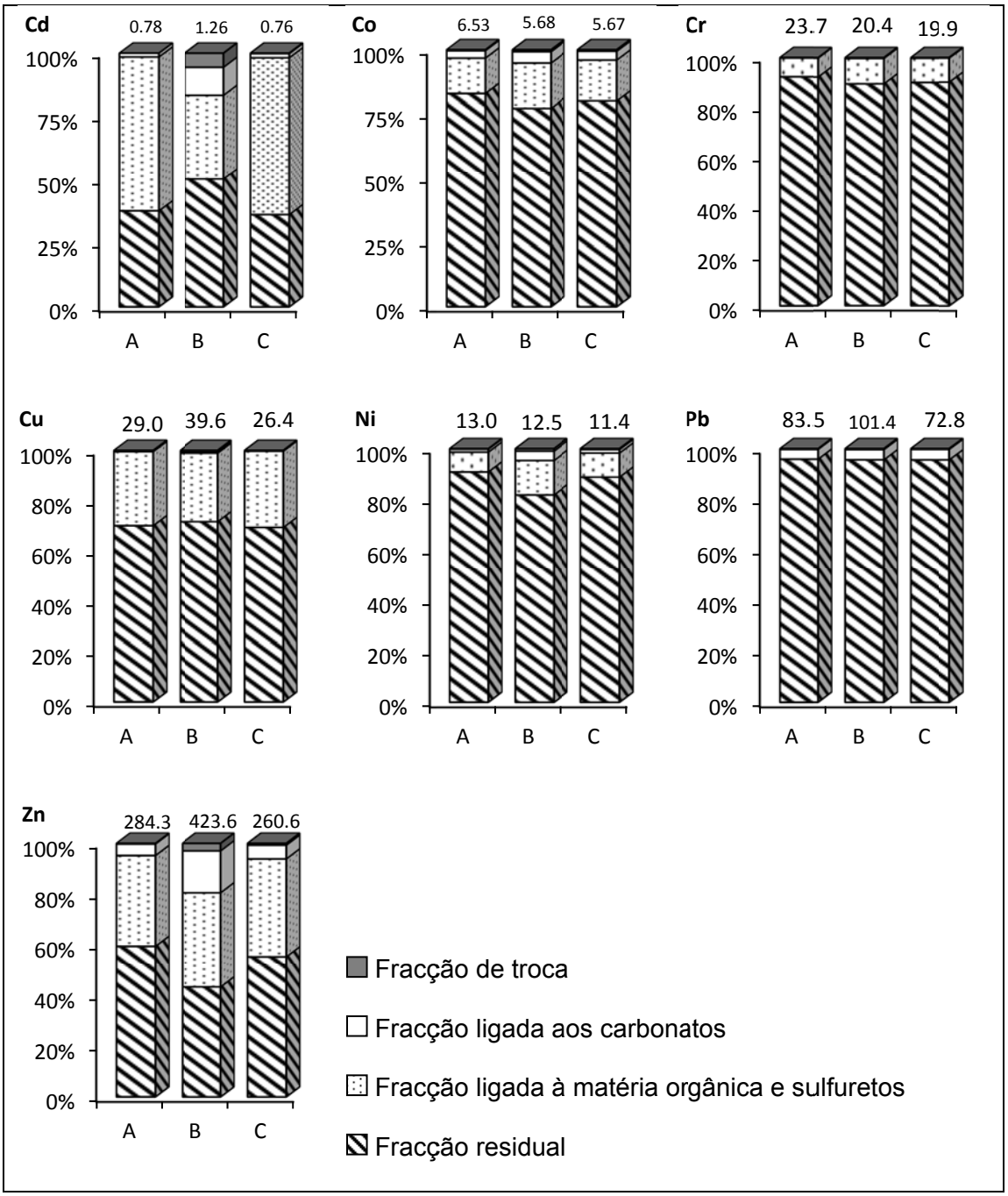

Figura 14 – Associações químicas de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn no sedimento inicial (A), *pellets* (B) e sedimento-controlo (C).

Os valores sobre as barras representam a soma das quatro fracções em $\mu g.g^{-1}$ (peso seco). Na análise da fracção ligada ao complexo da matéria orgânica e sulfuretos (Tab. III) foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os *pellets* e os restantes grupos para o Co, o Ni e o Zn, não havendo diferenças significativas entre o sedimento inicial e o controlo ($p>0.05$); os *pellets* a

evidenciarem maior concentração destes elementos que os outros dois grupos. Os valores de p para as diferenças encontradas entre o sedimento inicial e os *pellets* para o Co, Ni e Zn foram, respectivamente, p=0.017, p=0.000 e p=0.000. Os valores de p para as comparações entre os *pellets* e o controlo para os mesmos elementos foram, respectivamente, p=0.04, p=0.009 e p=0.010. Os valores de Pb ligados ao complexo matéria orgânica-sulfuretos estiveram, invariavelmente, abaixo do limite de detecção, não sendo por isso possível avaliar quaisquer diferenças entre grupos. Praticamente todo o Pb detectado nas amostras encontrou-se ligado à fracção residual, e apesar de no MDS os *pellets* aparecerem individualizados do sedimento inicial e do controlo, a maior diferença reside no facto da concentração de Pb total ter aumentado neste grupo. À semelhança do que se verificou na fracção ligada aos carbonatos, o Cr não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos grupos analisados. Para os restantes elementos, Cd e Cu, foram detectadas diferenças entre os *pellets* e o controlo (p=0.037 e p=0.032, respectivamente) mas nenhum destes grupos apresentou diferenças estatisticamente significativas do sedimento inicial (p>0.05).

A ordem de grandeza destes elementos não diferiu substancialmente entre os três grupos, apesar das diferenças estatisticamente significativas encontradas. A ordenação dos dados (Fig. 13) mostrou que, para o Cu, nas amostras dos *pellets* não apresentaram muita homogeneidade apesar de separadas do sedimento inicial e do controlo.Na fracção residual, o Cd, Cu, Pb e Zn apresentaram diferenças entre os *pellets* e o controlo (p=0.004, p=0.004, p=0.003 e p=0.016, respectivamente) mas não entre o sedimento inicial e os outros dois grupos (p>0.05), (Tab. III), mantendo-se a tendência para valores mais elevados nos *pellets*. Na acumulação do Co, o Cr e o Ni nesta fracção não foram encontradas quaisquer diferenças entre grupos (p>0.05). Conforme referido anteriormente, é na fracção residual que se encontram as maiores concentrações para todos os elementos, com destaque para o Co, o Cr, o Ni e o Pb (80 a 95% ligados a esta fracção)

Tabela III - Resultados das comparações *a posteriori* para a acumulação de metais nas diferentes fracções do sedimento entre os três grupos: sedimento inicial (A), *pellets* (B) e sedimento controlo (C). Símbolos diferentes (○ , ●) representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p<0.05$)

Fracção →	**Troca**			**Carbonatos**			**Matéria orgânica e sulfuretos**			**Residual**			**Total**		
Metal	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Cd	○	○	○	○ , ●	○	●	○ , ●	○	●	○ , ●	○	●	○	○	○
Co	○	○	○	○ , ●	○	●	○	●	○	○	○	○	○	○	○
Cr	-	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cu	○	○	●	○ , ●	○	●	○ , ●	○	●	○ , ●	○	●	○	○	○
Ni	○ , ●	○	●	○	●	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○
Pb	○	○	○	○ , ●	○	●	-	-	-	○ , ●	○	●	○	○	○
Zn	○	○	●	○	●	○ , ●	○	●	○	○ , ●	○	●	○	○	○

A soma das concentrações dos elementos analisados nas quatro fracções (troca, carbonatos, complexo matéria orgânica-sulfuretos e residual) evidenciou um aumento considerável nos *pellets* para o Cd e Zn, e também para o Pb e Cu, embora com menor expressão nestes que nos dois elementos referidos anteriormente (Fig. 14). Um aumento semelhante foi também verificado na concentração total dos mesmos elementos (Tab. IV). Finalmente, ao analisar a acumulação total de metais nas amostras de sedimento inicial, *pellets* e controlo (Tab. IV), não foram, igualmente, encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p>0.05$) (Tab. III).

Tabela IV - Concentração total média dos metais nas amostras de sedimento inicial (A), *pellets* (B) e controlo (C) ($\mu g.g^{-1}$, peso seco)

	Metais Pesados						
Amostras	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
A	0.97	6.97	26.07	33.20	15.28	95.75	316.47
B	1.34	5.68	20.05	42.43	13.36	113.45	430.71
C	0.93	7.34	25.67	34.52	15.38	101.21	325.18

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que tanto a matéria orgânica quanto o tamanho de partículas têm influencia na especiação de metais pesados no sedimento. De acordo com Thorne & Nickless (1981), os metais pesados associados a diferentes tamanhos de partículas aumentam com a diminuição do tamanho das partículas. Muitos estudos têm demonstrado que a concentração de metais pesados no sedimento está relacionada com o tamanho das partículas e com a concentração de matéria orgânica no sedimento (Förstner 1979, Thorne & Nickles 1981). A análise da distribuição das partículas deste trabalho quanto à sua granulometria evidenciou amostras no sedimento inicial que diferiam substancialmente das restantes amostras. Isso levou a que fossem rejeitadas na análise de metais pesados, considerando que o principal objectivo deste trabalho se prendeu com a determinação da influência da lambujinha, *Scrobicularia plana*, na especiação química de elementos vestigiais do sedimento. Ao utilizar amostras com diferente granulometria não poderia ser testada a hipótese inicial de que o efeito observado seria devido à acção de *S. plana*. Também a matéria orgânica foi afastada como factor passível de influenciar a especiação química dos metais por não se terem encontrado diferenças significativas entre os vários grupos de amostras considerados. Tendo em conta estas informações, foi considerado que estariam reunidas as condições para avaliar a influência da *S. plana* no processo supra referido.

A concentração total de Cd, Cu, Pb e Zn aumentou nas amostras dos *pellets*. A baixa quantidade de amostras produzidas pela *S. plana* pode ter sido resultante da baixa taxa de excreção ocorrida durante a experiência, o que provavelmente resultou numa reduzida potência dos testes estatísticos na comparação entre os *pellets* e os outros dois grupos de amostras (*i.e.* sedimento inicial e controlo). Segundo Brown (1986) não é possível demonstrar um aumento significativo nas concentrações de metais em *pellets* sobre o alimento ingerido, quando a natureza do sedimento inicial

não tenha sido controlada durante o procedimento experimental. Porém, no presente estudo as características do sedimento foram previamente determinadas, sendo por isso possível estabelecer uma relação entre o sedimento ingerido e o sedimento excretado. Dessa forma, é evidente o aumento da concentração de Cd, Cu, Pb e Zn nos *pellets* a partir do sedimento originalmente fornecido aos exemplares. Cheggour *et al.* (1990) constatou no seu trabalho que o tubo digestivo, juntamente com o hepatopâncreas, são os principais pontos de acumulação de quase todos os metais. Bryan & Uysal (1978) concluíram que mais de 75% de todos os metais encontrados em *S. plana* está concentrado nos tecidos moles da glândula digestiva. A eliminação de metais pelos moluscos pode ocorrer por dessorção pela superfície do corpo e por excreção pelas membranas permeáveis - processo rápido - e também pela ingestão de material não assimilado e exocitose de concentrações de materiais ricos, pelo aparelho digestivo - que é lento (Langston *et al.*, 1998). A combinação destes processos poderá estar na origem do aumento das concentrações de metais verificado nos *pellets* de *Scrobicularia plana.*

Observaram-se diversas alterações no fraccionamento dos metais pesados analisados nos *pellets*. Nomeadamente, o Cd, Ni e Zn surgiram em maior proporção na fracção de troca (ou fracção disponível) e o Cu aumentou nas duas fracções sucessivas, a dos carbonatos e a da matéria orgânica e sulfuretos, depois da passagem pelo tracto digestivo das lambujinhas, ou seja, nos *pellets*. É importante ressalvar, contudo, que a concentração total de Cd, Cu e Zn aumentaram nestas amostras, pelo que o aumento verificado na fracção disponível pode dever-se apenas ao aumento desses elementos nas amostras consideradas. Apenas o Ni evidenciou aumentou da biodisponibilidade sem que se tenha verificado um aumento correspondente na concentração total deste metal nos *pellets* de *S. plana*. Os *pellets* são constituídos principalmente por materiais não absorvidos pelo tracto digestivo dos moluscos e que sofrem frequentemente alterações químicas. Orvain (2005) demonstrou que a presença de *S. plana* altera as fases de erosão do sedimento, tanto

do sedimento superficial (mais móvel) como das camadas mais profundas, e que a extensão das actividades de bioturbação é influenciada pela densidade de bivalves. Esta bioturbação irá afectar o equilíbrio do potencial de oxidação-redução da camada superficial do sedimento: os sedimentos anóxicos que se encontram imediatamente abaixo da superfície são separados da coluna de água por uma camada oxidada. Os animais que se alimentam de partículas sedimentadas, como a *S. plana*, vivem na superfície anóxica, enterrados no sedimento, porém usam seu sifão inalante para se alimentarem na superfície oxidada. De acordo com o trabalho de Ngiam & Lim (2001), a oxidação do sedimento anóxico tende a promover uma diminuição das fracções de metais ligados à matéria orgânica e sulfuretos e aumentar as outras fracções, especialmente no caso de metais como o Cd, Zn e Pb. A oxidação da matéria orgânica e dos sulfuretos poderá originar formas mais solúveis, especialmente através da formação de sulfatos a partir da oxidação de sulfuretos, visto que os sulfatos têm maior solubilidade que os sulfuretos.

Neste estudo, a concentração de Cd e Zn nos *pellets* sofreu um incremento substancial. Conforme referido, o aumento da concentração total é provavelmente a melhor explicação para a alteração no fraccionamento destes metais, juntamente com o provável aumento na acidez aquando da passagem do sedimento pelo tracto digestivo da *S. plana*. De acordo Pyane & Thorpe (1993), o pH nos divertículos digestivos de *S.plana* é de 5.6, o que pode ter contribuído para as alterações verificadas na distribuição dos metais pelas fracções que foram definidas no processo de extracção sequencial. A proporção de Ni ligado a fracções mais disponíveis do sedimento (de troca e ligado a carbonatos) aumentou nos *pellets*. O níquel presente na fracção ligada à matéria orgânica e sulfuretos apresentou também um aumento nos *pellets*, quando comparado com as amostras de sedimento inicial. O factor mais importante na solubilidade do Ni é a acidez do meio, que com a redução dos valores de pH provoca aumento na solubilidade (Förstner, 1993). Entre outros factores é necessário considerar que o aumento de acidez do meio promove um aumento de

protões que vão competir com os catiões metálicos pelos mesmos locais de ligação, inclusivamente nos sulfuretos, formando-se neste caso sulfureto de hidrogénio, ou gás sulfídrico (H_2S). Assim, a acidificação esperada com a passagem do sedimento através do tracto digestivo da *S. plana* (Payne & Thorpe, 1993) poderá favorecer a solubilidade do Ni. O Cu, um oligoelemento com baixa mobilidade (Baker & Senft *in* Alloway, 1995), surgiu em maior quantidade na fracção ligada aos carbonatos e na fracção ligada à matéria orgânica e sulfuretos nos *pellets*. O aumento desta fracção foi, no entanto, pequeno, o que está de acordo com a baixa mobilidade deste metal. À semelhança do Cd e do Zn, também o aumento da concentração total de Cu nas amostras dos *pellets* poderá estar a influenciar aquilo que parece ser uma transferência entre fracções.

Ao contrário dos metais discutidos acima, o Cr não apresentou diferenças estatísticas significativas na partição de metais entre os três grupos de amostras, e não se verificou um aumento na concentração total deste elemento. Quanto ao Co e Pb, apesar de evidenciarem algumas diferenças estatísticas, uma análise mais detalhada sobre a variação verificada torna evidente que essas diferenças serão provavelmente influenciadas pela baixa potência dos testes estatísticos, conferida pelo número de amostras reduzido. A acumulação de Co e Pb nos *pellets* manteve-se dentro da mesma ordem de grandeza que os outros dois grupos de amostras, pelo que não terá havido influência da variação total destes dois metais na sua especiação. A baixa solubilidade e mobilidade do Pb estão de acordo com o facto de que quase nenhuma alteração foi encontrada entre o sedimento inicial e os *pellets*.

CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível observar que a actividade da lambujinha, *S. plana*, favorece potencialmente a disponibilização de determinados elementos para o biota, principalmente a biodisponibilidade do Ni, através da deposição dos *pellets* na superfície do sedimento estuarino. Esta é também a camada de sedimento utilizada

preferencialmente pelos invertebrados que se alimentam de partículas sedimentadas, devido à sua riqueza em matéria orgânica, pelo que o aumento destes biodepósitos implicará directamente um aumento da exposição dos macroinvertebrados bentónicos, e de outros organismos que ocupam o mesmo nicho trófico, ao Ni. Em relação aos restantes elementos não foi possível retirar conclusões neste sentido, apesar de os resultados apontarem para que estes organismos não influenciem a biodisponibilidade do Co, do Cr e do Pb.

Considerando os resultados obtidos, torna-se evidente que a informação conseguida até ao momento deverá beneficiar com um alargamento da dimensão da experiência realizada. Dessa forma deverá ser atingida uma maior segurança nas conclusões retiradas, principalmente devido ao aumento da potência dos testes estatísticos.

7 REFERÊNCIAS

Aller R.C. and J. Y., Aller (1998) The effect of biogenic irrigation intensity and solute exchange on diagenetic reaction rates in marine sediments. Journal of Marine Research, 56: 905-936.

Baker D.E., Senft J.P. (1995) Copper. In: Alloway B.L. (Ed.): Heavy Metals In Soils. Chapman & Hall, London, 179–202.

Berg, D. J., Fisher, S. W. & Landrum, P.F. (1996) Clearance and Processing of Algal Particles by Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) Journal of Great Lakes Research, 22: 779-788.

Boaden, P.J.S. & R. Seed (1985) An introduction to coastal ecology. Blackie and Sons, 218p

Brown, S. L. (1986) Feces of intertidal benthonic invertebrates: influence of particle selection in feeding on trace element concentration, Marine Ecology - progress series mar. ecol. prog. ser. Vol. 28: 219-231.1.

Bryan, G. W. and Uysal, H. (1978) Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from the Tamar Estuary in relation to environmental levels. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 58: 89-108.

Bryan, G.W., Hummerstone, L.G. (1977) Indicators of heavy metal contamination in the Looe estuary (Cornwall) with particular regard to silver and lead. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 57: 75-92

Byrne, P.A., O'Halloran, J., (2001). The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. Hydrobiologia, 465: 209-217.

Cain, D. J. and Luoma, S. N. (1990) Influence of seasonal growth, age and environmental exposure on Cu and Ag in a bivalve indicator, *Macoma balthica* in San Francisco Bay. Marine Ecology Progress Series, 60: 45 - 55.

Cheggour, M.,Texier, H., Moguedet, G. & Elkaïm, B. (1990) Metal exchanges in the fauna sediment system. The case of *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, in the Bou Regreg estuary (Morocco).

Cobelo-García A., Prego, R., Nieto, O. (2003) Chemical speciation of dissolved lead in polluted environments. A case of study: the Pontevedra Ria (NW Spain). Cienc Mar 29: 377–388.

Cossa, D., E. Bourget and J. Piuze (1979) Sexual maturation as a source of variation in the relationship between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis* L. Marine Pollution Bulletin 10 6: 174–176.

Di Toro, D. M., Mahony, J. D., Hansen.,D. J., Scott, K. J., Hicks, M.B., Mayr, S.M., Redmond, M.S.; (1990) Toxicity of Cadmium in Sediments - The Role of Acid Volatile Sulfide. Environ.Toxicol. Chem. 9 (12): 1487-1502.

Förstner, U. (1979). Metal transfer between solid and aqueous phases. In: Förstner, U., Wittman, G. T. W. (ed.) Metal pollution in the aquatic environment. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p. 197-27.

Förstner, U. (1993). Metal speciations: general concepts and applications. Int. J. Environ. Anal.Chem. 51, 5–23.

Fowler, S. W. (1982) Biological transfer and transport processes. In Pollutant Transfer and Transport in the Sea, ed. G. Kullenberg. CRC Press, Boca Raton, FL, USA,

García-Luque, E., Del Valls. T .A., Casado-Martínez, C., Forja, J.M., Gomez-Parra, A. (2004) Simulating a heavy metal spill under estuarine conditions: effects on the clam *Scrobicularia plana*. Marine Environmental Research

Hughes, R. N (1969), A study of feeding in *Scrobicularia plana*. Journal of Marine Biology Assessment UK 49, 805–823.

Hughes, R. N. (1970) Population dynamics of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa) on an intertidal mud flat in North Wales. Journal of Animal Ecology, 39: 333–356

Hullebusch E.D., P. N. L., Tabak H.H. (2005) Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides: 3.Influence of chemical speciation and bioavailability on contaminants immobilization/mobilization bio-process. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 4: 185-212.

Langston, W.J., Bebianno M., J, Burt. G. R (1998) Metal handling strategies in molluscs. In: Langston WJ, Bebiano M.J (eds) Metal metabolism in the aquatic environment.Chapman and Hall, London, United Kingdom, pp 219–27.

Lee, B.G and Louma, S. N. (1998) Influence of microalgal biomass on absorption efficiency of Cd, Cr, and Zn by two bivalves from San Francisco Bay Limnology and Oceanography, 43: 1455-1466.

Long, E. R., MacDonald, D. D., Smith, S. L., and Calder, F. D. (1995) Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments: Environmental Management, 19: 81 - 97.

Luoma, S. N & Bryan G. W. (1982) A statistical study of environmental factors controlling concentrations of heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Nereis diversicolor*, Estuarine Coastal and Shelf Science, 15: 95-108.

Meylan, S., Behra, R., Sigg, L. (2004) Influence of Metal Speciation in Natural Freshwater on Bioaccumulation of Copper and Zinc in Periphyton: A Microcosm Study. Environmental Science and Technology, v. 38, p. 3104-3111.

Meysman, F. J. R., O. S. Galaktionov, B. Gribsholt, and Milddelbug, J. J (2006) Bio-irrigation in permeable sediments: advective pore water transport induced by burrow ventilation. Limnology and Oceanography, 51:142–156.

Mikac, N., Kwokal, Z., Martincic, D., Branica, M (1996) Uptake of mercury species by transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* under estuarine conditions (Krka river estuary). The Science of the Total Environment, 184: 173-182.

Monperrus, M., E. Tessier, D. Amouroux, A. Leynaert, P.Huonnic, And Donard, O. F. X (2007) Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. Marine Chemistry, 107: 49–63.

Mouneyrac, C., Amiard, J. C. & Amiard-Triquet, C. (1998) Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, cooper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crossostrea gigas* from a polluted estuary. Marine Ecology Progress Series. 162: 125-135.

Murray, S. O., Kersten, D., Olshausen, B. A., Schrater, P., & Woods, D. L (2002) Shape perception reduces activity in human primary visual cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 15164–15169.

Navarro, J.M & RJ Thompson (1997) Biodeposition by the horse mussel *Modiolus modiolus* (Dillwyn) during the spring diatom bloom. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 209: 1-13.

Ngiam, L-S and Lim, P-E. (2001). Speciation patterns of heavy metals in tropical estuarine anoxic and oxidized sediments by different sequential extraction schemes. The Science of the Total Environment, 275: 53-61.

Orvain, F., (2005) A model of sediment transport under the influence of surface bioturbation: generalization to the facultative suspension-feeder *Scrobicularia plana.* Marine Ecology Progress Series, 286, 43-56.

Packham, J.R. & Willis, A.J. (1997) Ecology of dunes, saltmarsh and shingle, Chapman and Hall, London.

Payne, D.W.and Thorpe, N. A (1993) Carbohydrate digestion in the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa) Comparative Biochemistry and Physiology Part B: 104: 499-503.

Phillips, D. J. H (1976) The common mussel *Mytilys edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. Effects of environmental variables on the uptake of metals. Marine Biology, 38: 59-69.

Pritchard, D.W. (1967) What is an Estuary: Physical View Point. In: Lauff, G.H. (eds).

Ružić, I (1996) Trace metal complexation at heterogeneous binding sites in aquatic systems. Marine Chemistry, 53, 1.

Sanders, H. L (1958) Benthic studies in Buzzards Bay.1. Animal-sediment relationships. Limnology and Oceanography 3:245-258.

Small, L. F., and Fowler, S. W (1973) Turnover and vertical transport of zinc by the euphausiid *Meganyctiphanes norvegica* in the Ligurian Sea. Marine Biology, 18: 284-290.

Snelgrove, P.V.R. & Butman, C. A (1994) Animal-sediment relationships revised: cause *versus* effect. Oceanography and Marine Biology Annual Review, 32: 111-177.

Sokal, R. R & Rohlf, F. J. (1995) Biometry, 3rd edn. W. H. Freeman, New York.

Tebble, N. (1976). British bivalve seashells. A hand book for identification. 2nd edn. Edinburgh, HMSO, for Royal Scottish Museum.

Tessier, A., Campbell, P. G. C., And Bisson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals - Analytical Chemistry, 51: 844-851.

Thorne, L. T. And Nickless, G. (1981) The relation between heavy metals and particle size fractions within the severn estuary (u.k.) intertidal sediments. The Science of the Total Environment, 19: 207-213

Verdelhos, T., Neto, J.M., Marques, J.C., Par, M.A. (2005) The effect of eutrophication abatement on the bivalve *Scrobicularia plana* - Estuarine Coastal and Shelf Science 63 261–268.

Warren L. A, Tessier A, Hare L (1998) Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates *in situ*: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. Limnol Oceanogr 43:1442–1454

Wiegert, R. G., Pomeroy, L. R., Wiebee, W. J., (1981), Ecology of salt marshes: An Introduction, in, Pomeroy, L. R., and Wiegert, R. G., eds, The Ecology of Salt Marsh. New York: Springer-Verlag, p. 3-36.

Wiegert, R.G. and B.J. Freeman. 1990. Tidal salt marshes of the Southeast Atlantic coast: a community profile. U.S. Fish and Wildlife Service. Biol. Rep. 85(7.29).

Zamuda CD, Wright DA, Smucker RA (1985) The importance of dissolved organic compounds in the accumulation of copper by the American oyster, *Crassostrea virginica*. Mar Environ Res 16:1–12.

Zar, J. H (1999) Biostatistical analysis. 4th edn Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.