

Nuno Gabriel Marinho Barbosa



**Determinação da contaminação por metais pesados
(Cd, Pb, Hg, Cu e Zn) na amêijoia-branca *Spisula solida*
(Linnaeus, 1758)**



**Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente – Ecologia e Gestão
dos Recursos Naturais**

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Outubro / 2009

Universidade do Porto

Faculdade de Ciências

Determinação da contaminação por metais pesados (Cd, Pb, Hg, Cu e Zn) em *Spisula solida* (Linnaeus, 1758)

Por:

Nuno Gabriel Marinho Barbosa

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de mestre em Ciências e Tecnologias do Ambiente
- Ramo de Ecologia e Gestão dos Recursos Naturais

Orientador da FCUP: Prof. Doutor Paulo Talhadas Santos

Orientador do INRB, I.P./IPIMAR: Eng.º Carlos Vale

Porto

2009

Agradecimentos

Gostaria de deixar os meus agradecimentos e reconhecimento a todos os que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho:

À minha família por tudo;

Ao meu orientador professor Doutor Paulo Santos pela ajuda e conselhos dados;

Ao meu orientador Eng.º Carlos Vale que, apesar da distância, esteve sempre disponível para me ajudar;

À Doutora Fernanda Castilho, e restante equipa do Ipimar Matosinhos, pela maneira como me receberam e pelo contributo dado neste trabalho;

Aos meus amigos;

A todos os que me acompanharam ao longo deste percurso;

Obrigado

Sumário

Este trabalho tem por objectivo determinar a concentração dos metais cádmio, chumbo, mercúrio, cobre e zinco na amêijoia-branca (*Spisula solida*) e avaliar as diferenças de contaminação nos vários locais de captura, bem como ao longo do período de amostragem.

Para a elaboração deste trabalho foram recolhidas, por barcos de pesca comercial, amostras de *Spisula solida* na costa Norte de Portugal Continental entre Janeiro e Julho de 2009. Foram seleccionados quinze indivíduos em cada amostra e devidamente preparados para proceder à análise do teor de Cd, Pb, Hg, Cu e Zn.

O zinco apresentou os valores mais elevados dos metais analisados, o que era esperado dada a elevada concentração deste metal nas águas costeiras de Portugal Continental.

De um modo geral, não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) da concentração dos metais pesados entre os locais de amostragem e ao longo do período de amostragem.

Todos os metais analisados apresentaram concentrações máximas entre Fevereiro e Maio, na época de reprodução, e os teores mais baixos no Verão.

Os valores determinados em amostras de *Spisula solida* apresentam-se todos abaixo dos limites estabelecidos por lei (Regulamento Comunitário (CE) nº 466/2001).

Palavras-chave: *Spisula solida*; metais; cádmio; chumbo; mercúrio; cobre; zinco; costa Norte de Portugal.

Abstract

The aim of this work is to assess the concentration of metals cadmium, lead, mercury, copper and zinc in white clam (*Spisula solida*) and evaluate the contamination differences between the samples locations and during the sampling period.

For the elaboration of this work *Spisula solida* samples were collected, by commercial fishing boats, on Portuguese north shore between January and July of 2009. Fifteen individuals were selected, in each sample, and properly prepared to proceed to the analysis of Cd, Pb, Hg, Cu and Zn concentrations.

Zinc presents the highest values of all metals analyzed, what was expected given the high concentration of this metal in the Portuguese coastal waters.

In general, no significant differences ($p < 0,05$) were found for metal concentration as function of samples locations and during the sampling period.

All metals present the highest values between February and May, on reproduction season, and the lowest values of concentration in the summer.

The values obtained in *Spisula solida* samples are all bellow the legal limits (Regulation EC n° 466/2001).

Keywords: *Spisula solida*; metals; cadmium; lead; mercury; copper; zinc; Portuguese north shore.

Simbologia e Notações

T – Temperatura

P – Pressão

v/v – Volume:volume

EAA – Espectroscopia de Absorção Atômica

LD – Limite de detecção

$\bar{\mathbf{X}}$ – Média

σ – Desvio padrão

F – Teste ANOVA

p – Probabilidade

t – Parâmetro t-Student

Índice

Índice	I
Índice de figuras.....	II
Índice de tabelas	III
Capítulo I- Introdução.....	1
1.Enquadramento temático	2
2.Metais pesados.....	2
2.1.Cádmio.....	2
2.2.Chumbo.....	3
2.3.Mercúrio.....	4
2.4.Cobre.....	5
2.5.Zinco	5
3.Bioacumulação de metais pesados em bivalves.....	6
4. <i>Spisula solida</i>	8
4.1.Classificação taxonómica.....	8
4.2.Distribuição e características gerais de <i>Spisula solida</i>	9
5.Estudos sobre a acumulação de metais pesados em <i>Spisula solida</i>	9
6.Objectivos.....	10
Capítulo II - Metodologia.....	11
1.Amostragem.....	12
2.Processamento das amostras	13
2.1.Preparação das amostras compostas	13
2.2.Determinação da concentração de metais pesados.....	13
2.3.Validação do procedimento analítico.....	15
2.3.1.Determinação do limite de detecção	15
2.3.2.Determinação do erro de precisão	16
3.Obtenção de informação sobre variáveis ambientais	17
4.Tratamento de resultados	17
Capítulo III – Resultados.....	18
1.Resultados das análises.....	19
2.Comparação com dados ambientais e fisiológicos	28
Capítulo IV – Discussão Geral	32
Discussão geral.....	33
Capítulo V – Conclusões	36
Conclusões	37
Capítulo VI - Bibliografia.....	38
Bibliografia	39

Índice de figuras

Figura 1 - Acumulação e eliminação de metais pelos organismos (Fonte: Connell e Miller, 1984, in Brito, 2003)	7
Figura 2 - Localização dos locais de amostragem de <i>Spisula solida</i> (Fonte: Google Earth).....	12
Figura 3 - Representação gráfica da concentração média mensal de cádmio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	19
Figura 4 - Representação gráfica da concentração média mensal de cádmio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	20
Figura 5 - Representação gráfica da concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	21
Figura 6 - Representação gráfica da concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	21
Figura 7 - Representação gráfica da concentração média mensal de mercúrio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	22
Figura 8 - Representação gráfica da concentração média mensal de mercúrio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	23
Figura 9 - Representação gráfica da concentração média mensal de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	24
Figura 10 - Representação gráfica da concentração média mensal de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	25
Figura 11 - Representação gráfica da concentração média mensal de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	26
Figura 12 - Representação gráfica da concentração média mensal de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.	27
Figura 13 - Concentrações de Cd, Pb e Hg ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso húmido) nas amostras analisadas. A linha representa os limites admissíveis pela legislação em vigor (Regulamento Comunitário (CE) n° 466/2001).....	28
Figura 14 - Representação gráfica da relação entre a concentração obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$, peso seco) e a temperatura a 30 metros de profundidade ($^{\circ}\text{C}$)	29

Figura 15 - Representação gráfica da relação entre a concentração obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$, peso seco) e o caudal médio mensal do rio Douro (m^3/s).30

Figura 16 - Representação gráfica da relação entre a concentração obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$, peso seco) e a época de postura. A linha representa o início do período de postura31

Anexos

Figura 17 - Ganchorra do norte, mostrando a boca e o respectivo saco de rede (Fonte: Ipimar)46

Índice de tabelas

Tabela 1 - Informação das amostras de *Spisula solida* seleccionadas13

Tabela 2 - Média e desvio padrão das concentrações certificadas e dos valores obtidos para os metais Cd, Pb, Hg, Cu e Zn do material de referência16

Tabela 3 - Níveis médios da concentração de Cd, Pb, Hg, Cu e Zn, em diferentes espécies de bivalves capturadas em diferentes locais, retiradas da bibliografia indicada.....35

Anexos

Tabela 4 - Características da ganchorra do norte47

Tabela 5 - Resultados do teste de Tukey realizado para o mercúrio ao conjunto de amostras mensais provenientes da Aguda48

Tabela 6 - Resultados do teste de Tukey realizado para o zinco ao conjunto de amostras mensais provenientes da Aguda48

Tabela 7 - Resultados das concentrações dos metais Cd, Pb, Hg, Cu e Zn obtidos nas amostras analisadas49

CAPÍTULO I

Introdução

1. Enquadramento temático

Os ecossistemas aquáticos são afectados por vários contaminantes onde se incluem os metais. A sua presença no meio ambiente pode ter origem natural mas o incremento nos últimos anos tem sido principalmente atribuído a fontes antropogénicas (Rashed, sem data; Goksu *et al.*, 2003; Bryan *et al.*, 1985). Estas fontes são diversas e de difícil controlo, pelo que estudos sobre a concentração de contaminantes tóxicos, como os metais, em organismos vivos se revelam de extrema importância para avaliar níveis de contaminação ambiental.

Os níveis de metais nos moluscos bivalves dependem da disponibilidade ambiental, sendo por isso alguns propostos como indicadores da qualidade ambiental (Turkman *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2007).

Dado o consumo dos bivalves pelo Homem e a sua capacidade para reter contaminantes metálicos, e outros contaminantes, a avaliação da retenção de metais nos seus tecidos tem importância prática ligada à segurança alimentar.

2. Metais pesados

Os organismos marinhos estão expostos a metais pesados resultantes dos processos biogeoquímicos e de contaminação ambiental (Engel e Brouwer, 1984, *in* Brito, 2003).

Existem metais que desempenham funções essenciais nos organismos (Cu e Zn), enquanto outros metais (Cd, Pb e Hg) não têm funções biológicas conhecidas o que permite uma interpretação mais clara da sua acumulação nos organismos.

2.1. Cádmi

O cádmio (Cd) é um metal que pertence ao grupo IIB da tabela periódica, que tem como massa atómica relativa 112,40 g/mol e como número atómico 48.

A principal fonte de libertação deste metal para a atmosfera é a actividade vulcânica, contudo é o maior fluxo de cádmio ocorre através de rios e oceanos devido a erosão (Gesamp, 1987 *in* WHO, 1992). As principais vias de entrada do cádmio no Homem são por inalação, absorção via gastrointestinal, absorção pela pele e por transferência mãe-feto através da placenta (WHO, 1992).

Este metal é considerado tóxico para os organismos marinhos em concentrações muito baixas, não desempenha funções metabólicas conhecidas, e ocorre em concentrações significativas no meio aquático, tendo uma elevada persistência no meio ambiente e um elevado tempo de meia-vida nos organismos (Robards e Worsfold, 1991, *in* Brito, 2003).

Vários estudos mostraram que o ião metálico Cd^{2+} é a forma de cádmio que se encontra mais disponível para os organismos aquáticos (Sunda *et al.*, 1978; Borgmann, 1983; Part *et al.*, 1985; Sprague, 1985 *in* WHO, 1992) e provoca malformações no endoesqueleto e alterações de comportamento e da reprodução, sendo as fases embrionária e larvar dos organismos aquáticos as mais sensíveis. (WHO, 1992).

Actualmente é utilizado em revestimentos protectores de aço, estabilizadores para PVC, pigmentos para plásticos e vidros, material de eléctrodo em baterias de níquel e cádmio e como componente de várias ligas metálicas (Wilson, 1988, *in* WHO, 1992).

2.2.Chumbo

O chumbo (Pb) pertence ao grupo IVA da tabela periódica e tem como número atómico 82 e massa atómica 207,19 g/mol.

As principais fontes naturais deste metal são as emissões vulcânicas e a erosão química, sendo a extracção mineira a principal fonte antropogénica (WHO, 1995). O chumbo na forma de tetraetilo e tetrametilo são exemplos de compostos ligados ao carbono sintetizados industrialmente e utilizados como aditivos em combustíveis (WHO, 1989a). O chumbo ocorre numa variedade de minerais, sendo os mais importantes a galena (PbS), a cerrusite (PbCO₃) e a anglesite (PbSO₄) (WHO, 1995).

A contaminação no Homem ocorre principalmente pela ingestão através de alimentos e bebidas contaminadas, embora também possa ocorrer por inalação de partículas, absorção via gastrointestinal e cutânea (WHO, 1995). A contaminação por Pb causa problemas nos rins, fígado, sistema reprodutor, cérebro e no sistema nervoso central (Manahan, 2000; Villarreal-Treviño *et al.*, 1986).

Este metal mantém-se durante largos períodos no meio ambiente, dada a sua baixa solubilidade, sendo que nos sistemas aquáticos só uma pequena fracção de Pb se encontra na água intersticial pois maioria deste metal adere ao sedimento (WHO, 1995). As concentrações de Pb existentes no mar não são particularmente tóxicas quando comparadas com outros metais não essenciais (Clark, 1997).

É principalmente utilizado em baterias, cabos, tintas e nos aditivos do petróleo (WHO, 1995).

2.3.Mercúrio

O mercúrio (Hg) pertence ao grupo 2B e tem como massa atômica 200,5 g/mol e número atômico 80.

As principais fontes naturais de Hg na atmosfera são a erosão natural da crosta terrestre e a libertação de gases vulcânicos. A mineração, queima de combustíveis fósseis, descargas de efluentes resultantes da produção industrial de plásticos, papel e baterias, incineração e o uso de mercúrio na agricultura, são as principais fontes antropogênicas (WHO, 1989b; Timbrell, 1995; Pimenta, 2007).

Quando o Hg se combina com elementos como o cloro, enxofre ou oxigênio, forma compostos de mercúrio inorgânico. Por outro lado, quando um átomo de mercúrio forma uma ligação covalente com pelo menos um átomo de carbono dá origem a compostos de mercúrio orgânico como o metilmercúrio. Esta é uma das formas mais tóxicas para os humanos e para os organismos aquáticos pois a afinidade deste composto com os grupos sulfídricos (-SH) de algumas proteínas aumenta a sua capacidade de ser acumulado (Brito, 2003).

Este metal é considerado de elevado risco ecotoxicológico para as espécies marinhas devido à toxicidade e capacidade de bioamplificação ao longo das cadeias tróficas (Fant *et al.*, 2001; Andres *et al.*, 2002, *in* Brito, 2003; Hernandez-Hernandez, *et al.*, 1990). Em ambientes aquáticos encontra-se, normalmente, associado a matéria particulada em suspensão. Estas partículas depositam-se no sedimento, sendo o sedimento um reservatório natural deste metal no ambiente (Cairrão *et al.*, 2007).

No Homem a principal via de contaminação é por inalação e é nos alvéolos que se verifica uma maior taxa de absorção. No entanto, a contaminação também ocorre através da ingestão de grandes quantidades de alimentos contaminados (WHO, 1976). As intoxicações por Hg apresentam uma graduação de efeitos proporcionais a sua ingestão e causam anemia, anorexia, depressão, fadiga, dores de cabeça, hipertensão, insónia, irritabilidade, tremores, fraqueza, problemas de audição e visão, sendo que em casos mais graves podem levar a inúmeros problemas neurológicos graves, inclusive paralisias cerebrais (WHO, 1976).

A toxicidade do mercúrio ficou bem demonstrada no conhecido caso da Baía de Minamata, no Japão entre 1953 e 1960, quando a ingestão de peixe e marisco contaminado por descargas duma fábrica na água causaram 43 mortes e foram observados 19 efeitos congénitos em bebés cujas mães ingeriram alimentos contaminados (Manahan, 2000).

O Hg é utilizado em instrumentos de medidas (termómetros e barómetros), lâmpadas fluorescentes e como catalisador em reacções químicas.

2.4.Cobre

O cobre (Cu) pertence ao grupo IB da tabela periódica e tem como número atómico 29 e massa atómica relativa 63,6 g/mol.

As principais fontes antropogénicas de Cu estão associadas a descargas industriais dos esgotos e às minas de cobre (Clark, 1997). O Cu é um elemento químico essencial ao ciclo de vida mas acima de determinadas concentrações é tóxico (Förstner e Wittmann, 1981). A deficiência em cobre está associada a anemia e a anomalias ósseas, enquanto a exposição crónica a níveis sub-letais de Cu pode reduzir o potencial de crescimento dos organismos, a capacidade reprodutiva, a capacidade de adaptação e competição com outras espécies (Diniz, 2000).

Este metal em pó é combustível e reage com oxidantes fortes podendo ocorrer explosões e actualmente é utilizado para a produção de materiais condutores de electricidade, tem alta condutibilidade eléctrica e térmica, ligas metálicas, equipamento eléctrico e catalisadores químicos (WHO, 1998).

2.5.Zinco

O zinco (Zn) tem como número atómico 30, massa atómica relativa 65,4 g/mol e pertence ao grupo 2B da tabela periódica.

É dos elementos essenciais mais abundante, aproximadamente 100 vezes superior ao cobre (Förstner e Wittmann, 1981), sendo a sua principal fonte natural a erosão, enquanto as antropogénicas são a mineração, a produção de aço e ferro, a corrosão de estruturas e o uso de pesticidas e fertilizantes (WHO, 2001b).

Este é um metal essencial para os processos metabólicos em concentrações naturais, e por isso, a sua toxicidade é difícil de avaliar, sendo que de um modo geral os vertebrados marinhos têm baixas concentrações de zinco comparativamente com

invertebrados (Perttila *et al.*, 1982; Devineau e Triquet, 1985, *in* Brito, 2003). O Zn intervém no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, estimula a actividade enzimática, colabora no bom funcionamento do sistema imunológico e na síntese do ADN (WHO, 2001).

A deficiência de Zn pode provocar um retardamento no crescimento, perda de cabelo, impotência sexual, apatia, depressão, lesões oculares e de pele, enquanto o seu excesso provoca a diminuição da função imunológica e a alteração dos níveis de colesterol (WHO, 2001b).

Este metal é utilizado à muito em ligas metálicas e a sua principal aplicação é na galvanização do aço e ferro para protegê-los da corrosão (WHO, 2001b).

3. Bioacumulação de metais pesados em bivalves

A bioconcentração é um conceito utilizado de modo a determinar a acumulação de uma substância num organismo em comparação com a existente num compartimento ambiental (WHO, 2001a). A bioacumulação pode ser considerada como um balanço entre dois processos cinéticos, acumulação e eliminação. No entanto, não têm em conta as transferências que ocorrem entre os tecidos e fluidos dos organismos (Connell e Miller, 1984, *in* Brito, 2003), sendo que alguns metais nunca são eliminados na totalidade.

De um modo geral, a acumulação dos metais ocorre segundo um padrão descrito na Figura 1.

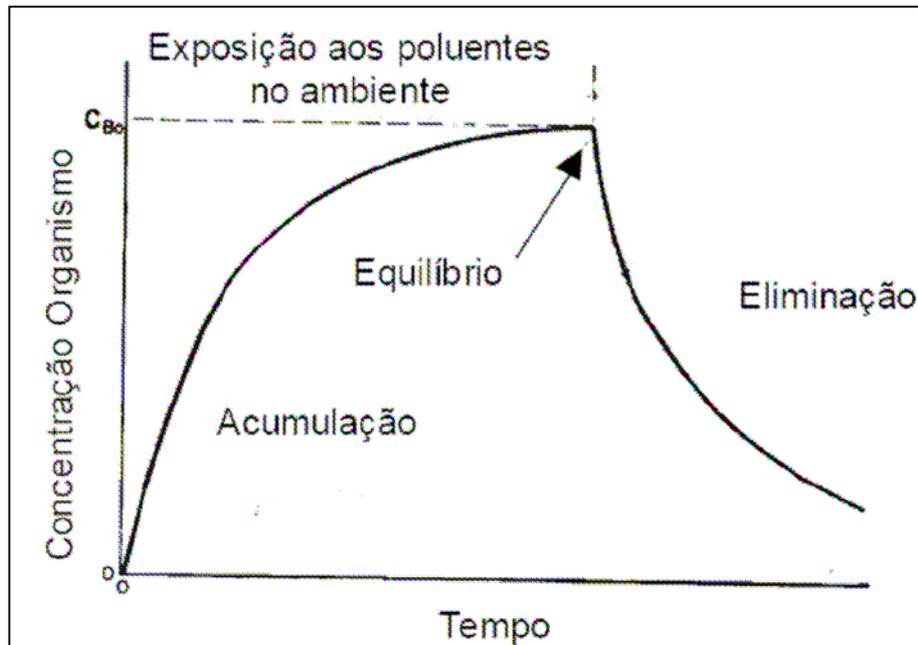


Figura 1 - Acumulação e eliminação de metais pelos organismos (Fonte: Connell e Miller, 1984, *in* Brito, 2003)

Quando um organismo é exposto a um metal, a concentração no organismo aumenta até os locais de ligação química ficarem ocupados (Langston *et al.*, 1998, *in* Brito, 2003), levando a uma diminuição da acumulação. O processo de eliminação passa a ser mais importante levando a uma diminuição dos níveis de metal nos tecidos dos organismos, no entanto a rapidez com que os metais são eliminados está dependente do tempo de semi-vida de cada um. Para acumularem elevadas concentrações de metais, essenciais ou não, os organismos necessitam de desenvolver sistemas de desintoxicação adequados (Finger e Smith, 1987), sendo que muitas vezes os processos de desintoxicação ou acumulação dos metais podem estar associados a processos celulares ou a processos fisiológicos, como a excreção.

Alguns organismos podem ser utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental, sendo que a selecção dos organismos está dependente de vários factores:

- Devem ser abundantes no local de estudo;
- Devem ter uma distribuição geográfica alargada;
- A fisiologia e ecologia dos organismos deve estar bem estudada;
- Devem ser organismos sésseis e filtradores, de modo a permitir amostrar o ambiente envolvente;

- Devem ter capacidade para sobreviver a níveis de contaminação que se pretendem monitorizar;
- Devem acumular rapidamente contaminantes químicos (pesticidas, hidrocarbonetos, metais, toxinas) nos seus órgãos com transformações metabólicas mínimas, reflectindo, por isso, de uma forma realista os níveis de contaminação ambiental (Vasconcelos, M., 1995, *in* Fernandes, S., 2008);
- Devem possuir respostas fisiológicas subletais, sensíveis a poluentes a diferentes níveis (molecular, celular, individual, populacional, comunidades), reflectindo grande parte dos mecanismos de toxicidade (Vasconcelos, M., 1995, *in* Fernandes, S., 2008);

Alguns moluscos bivalves reúnem muitas destas características e, por isso, são os organismos mais utilizados, particularmente os mexilhões, na monitorização de metais pesados em ambientes costeiros, sendo utilizados em vários programas mundiais de monitorização, como é o caso do Programa Mussel Watch (NCCOS, 2007).

4.Spisula solida

4.1.Classificação taxonómica

A amêijoia-branca apresenta a seguinte classificação sistemática (MarBef, 2009):

Reino Animalia

Filo Mollusca

Classe Bivalvia (Linnaeus, 1758)

Subclasse Heterodonta (Neumayr, 1884)

Infraclasse Euheterodonta

Ordem Euheterodonta incertae sedis

Superfamília Mactroidea (Lamarck, 1809)

Família Mactridae (Lamarck, 1809)

Género *Spisula*

Espécie *Spisula solida* (Linnaeus, 1758)

4.2. Distribuição e características de gerais de *Spisula solida*

A espécie *Spisula solida* encontra-se em grande parte do Atlântico Norte, desde a Islândia e a Noruega no subártico até às regiões temperadas de Portugal e Marrocos, no Sul da Europa e Norte de África (Marbef), e tem elevado interesse comercial na Europa e na América do Norte (Marlin, 2007). Habita as regiões marinhas costeiras pouco profundas, na costa Portuguesa encontra-se preferencialmente entre os 5 e os 13 metros de profundidade (Gaspar *et al.*, 1999), em sedimentos arenosos com uma granulometria entre 2 a 3 mm e com movimento de água (Kristensen, 1996).

Esta espécie tem uma longevidade de aproximadamente 10 anos (Fahy *et al.*, 2003) e nos dois primeiros anos de vida apresenta um ritmo de crescimento rápido (Gaspar *et al.*, 1995; Kristensen, 1996). Na concha existem marcas que sugerem anéis de crescimento. No entanto a sua interpretação não é directa e facilmente perceptível (Fahy *et al.*, 2003 *in* Sabatini, M., 2007; Gaspar *et al.*, 1995). Acerca da biologia das larvas/juvenis de *Spisula solida* não existe muita informação mas julga-se que têm um curto período de vida pelágica, como sucede com outros membros da família Mactridae (Loosanoff e Davis, 1963, Ropes, 1980; *in* Cargnelli *et al.*, 1999). Não há registo de indivíduos hermafroditas e os machos e as fêmeas podem ser distinguidos externamente uma vez que a cor das gónadas são diferentes, avermelhadas nas fêmeas e laranja-amarelado nos machos (Gaspar & Monteiro, 1999). A maturidade sexual desta espécie ocorre durante o primeiro ano de vida, o que acontece devido à idade e não ao tamanho (Gaspar & Monteiro, 1999; Fahy *et al.*, 2003).

A *Spisula solida* obtém a sua alimentação por filtração de partículas em suspensão na coluna de água, principalmente fitoplâncton.

5. Estudos sobre acumulação de metais pesados em *Spisula solida*

A espécie *Spisula solida* tem sido pouco utilizada em estudos de contaminação por metais pesados. Langston *et al.* (1999) efectuaram estudos de bioacumulação em organismos bentónicos do Dogger Bank, localizado no Atlântico Norte próximo da costa Este do Reino Unido, e análises físico-químicas dos sedimentos desta região. Para tal, determinou o nível de contaminação em duas espécies de bivalves, *Spisula solida* e *Venus striatula*, no gastrópode *Turritella communis* e no anelídeo *Melinna palmata*.

Para estes autores não foi evidente a bioacumulação de As, Hg e Pb, em relação ao Cd, eles mostraram que foi acumulado em todas as espécies em quantidades consideráveis,

tal como o Ni, Cr e o Mn. Os seus resultados permitiram concluir que a região do Dogger Bank apresenta níveis consideráveis de alguns metais, em particular de cádmio, devido à disponibilidade destes contaminantes nos sedimentos.

Num trabalho realizado entre 1985-1996 Vyncke, *et al.* (1999) mediram as concentrações de Hg, Cd, Pb, Cu, Zn e Cr, em onze locais da costa Belga, na espécie *Spisula subtruncata*. As concentrações médias obtidas, expressas em mg/kg peso húmido, foram de 0,02 para o mercúrio, 0,08 para o cádmio, 0,38 para o chumbo, 2,5 para o cobre, 12,7 para o zinco e 0,47 para o crómio. Não foram encontradas diferenças significativas entre os locais de amostragem, tendo ainda aqueles autores verificado uma tendência de diminuição das concentrações registadas, em comparação com estudos anteriores.

Não temos conhecimento de estudos da contaminação por metais pesados nesta espécie em Portugal. No entanto, existem estudos acerca da sua distribuição e abundância (Gaspar *et al.*, 2002), bem como da sua reprodução (Gaspar e Monteiro, 1999) e dos efeitos da pesca nas suas populações (Gaspar *et al.*, 2002).

6.Objectivos

Neste trabalho estudou-se a contaminação de metais pesados no molusco bivalve *Spisula solida*, que é uma espécie de elevado interesse comercial em Portugal.

Este trabalho teve como objectivos:

- Determinar a concentração dos metais cádmio, chumbo, zinco, cobre e mercúrio em *Spisula solida* proveniente da costa portuguesa, entre a Foz do Douro e a Torreira com um ponto intermédio na Aguda;
- Averiguar a existência de diferenças de contaminação em *Spisula solida* entre os diferentes locais de amostragem;
- Averiguar a existência de diferenças de contaminação em *Spisula solida* entre o Inverno e a Primavera/Verão;
- Obter experiência de trabalho laboratorial;
- Obter experiência de análise de dados;

CAPÍTULO II

Metodología

1. Amostragem

As amostras de *Spisula solida* utilizadas neste trabalho foram recolhidas na costa Norte de Portugal Continental, na Foz do Douro, Aguda e Torreira (Figura 2).

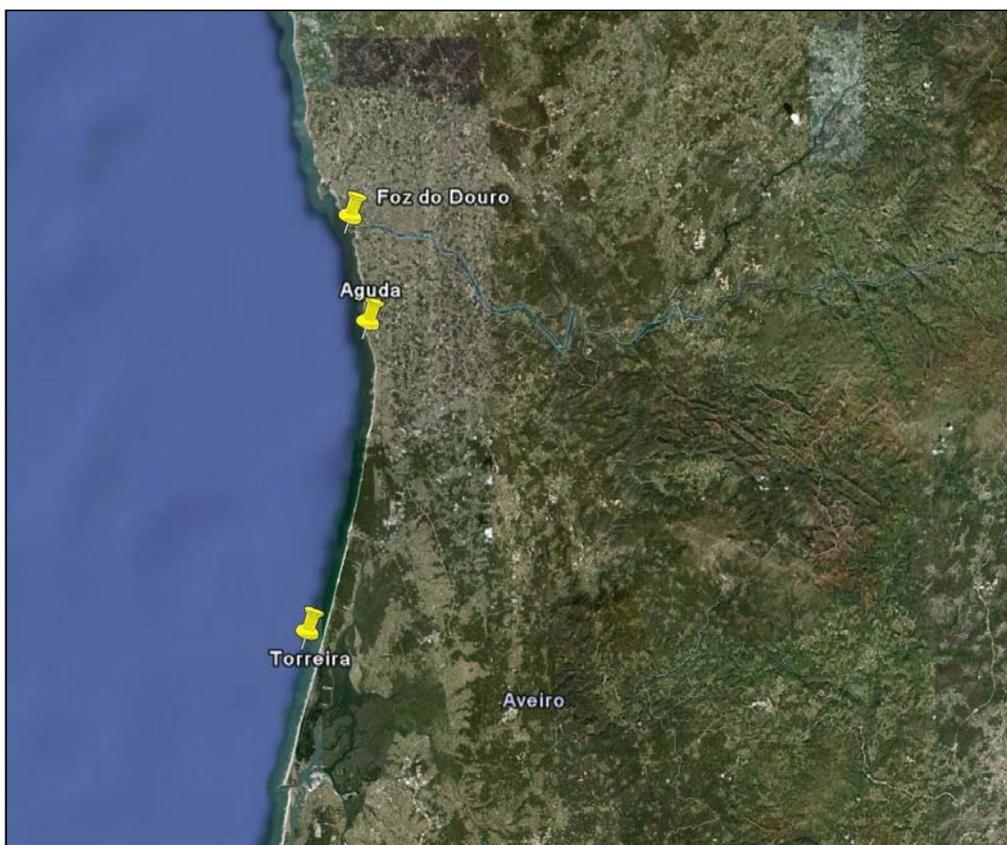


Figura 2 - Localização dos locais de amostragem de *Spisula solida* (Fonte: Google Earth)

A amostragem foi efectuada por barcos de pesca comercial utilizando a ganchorra do norte (características desta arte de pesca em Anexos, Tabela 4 e imagem 17), tendo decorrido semanalmente entre Janeiro e Julho de 2009. No período de defeso da espécie, 15 de Maio a 15 de Junho, não decorreu qualquer amostragem.

As coordenadas dos locais de captura, os períodos de amostragem, o número de amostras, o tamanho e peso médio das amostras seleccionadas estão na tabela 1.

2. Processamento das amostras

2.1.Preparação das amostras compostas

A fase inicial da preparação de cada amostra consistiu na selecção e medição de quinze indivíduos de *Spisula solida* de tamanho semelhante. Foi feita uma amostra composta de 15 indivíduos sem atender ao sexo. A estes indivíduos foi removida a parte edível e colocada num copo. A amostra foi homogeneizada com o auxílio de uma varinha mágica e transferida para um frasco até ser liofilizada. A liofilização decorreu a uma temperatura inferior a -50°C e a uma pressão inferior a 1000mBar, num aparelho Cryodos da “Telstar”. Após a liofilização as amostras foram colocadas em frascos devidamente rotulados e armazenadas para posterior análise de metais.

Tabela 1 - Informação das amostras de *Spisula solida* seleccionadas

Local	Foz do Douro	Aguda	Torreira
Coordenadas	41° 08' 360'' N 08° 39' 480'' W	40° 57' 800'' N 08° 45' 320'' W	40° 45' 000'' N 08° 47' 000'' W
Período Amostragem	12 Janeiro a 15 de Maio e 16 de Junho a 21 de Julho		
Tamanho médio	27,1 ± 1,27 mm	26,9 ± 1,52 mm	24,2 ± 1,27 mm
Peso médio	31,5 ± 1,1 g	30,2 ± 7,1 g	27,2 ± 0,5 g
Número de amostras	4	14	2

2.2.Determinação da concentração de metais pesados

Na determinação da contaminação dos metais Cd, Pb, Cu e Zn é necessário efectuar, previamente, uma digestão das amostras. Para tal pesaram-se 200 mg ± 0,0001 mg de amostra liofilizada para uma autoclave de teflon, à qual se adicionaram 4 cm³ de HNO₃ (*sp*, 65% v/v). A autoclave foi colocada a uma temperatura de 60 °C durante 12h, aumentando-se para 100°C durante 1h. Em seguida deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e adicionaram-se 2 cm³ de H₂O₂ (*sp*, 30% v/v). A autoclave aberta foi colocada a uma temperatura de 80 °C durante 1h (Ferreira *et al.*, 1997 *in* Brito, 2003). Após arrefecer, a solução final foi aferida a 50 cm³ com água Milli-Q e guardada para posterior análise por espectroscopia de absorção atómica (EAA) na chama, no caso do Zn, ou em forno de grafite, no caso do Cu, Cd e Pb.

As determinações de Hg, de acordo com o procedimento padronizado em uso no IPIMAR (Procedimento técnico de química instrumental - Hg), foram efectuadas por um analisador de mercúrio, modelo DMA80 (Direct Mercury Analyser) da Millestone. Pesaram-se aproximadamente $40 \text{ mg} \pm 0,0001 \text{ mg}$ de amostra liofilizada para uma barquinha de quartzo que se insere num tubo de combustão de quartzo que contém um catalisador onde a amostra é seca e posteriormente sujeita a uma temperatura na ordem dos 850°C , sendo todo o conteúdo atomizado. Os átomos de Hg passam numa célula de ouro formando uma amálgama com esta. O sistema é completamente limpo por um fluxo contínuo de oxigénio e, posteriormente, a célula de puro é aquecida, libertando o Hg nela contido. Esse Hg irá passar numa célula em que será medida a absorvância da quantidade de Hg que por lá passa. A quantificação de Hg é feita, então, por absorção atómica sem chama. As condições típicas de operação são: tempo de secagem, 90 s; tempo de decomposição, 180 s; tempo de espera, 60 s (Pimenta, 2007).

A espectroscopia de absorção atómica (EAA) é um método de análise que permite a determinação de metais com grande sensibilidade e rigor, sendo por tal utilizado na detecção de metais vestigiais em amostras ambientais (Gonçalves, 1990 *in* Brito, 2003). Esta técnica utiliza basicamente o princípio de que átomos livres (estado fundamental) são capazes de absorver radiação de frequência específica que é emitida por uma fonte espectral (Borges *et al*, 2005).

A incidência de radiação e a sua conseqüente absorção pelos átomos provoca uma passagem do estado fundamental para um estado excitado. No processo de absorção atómica a radiação de intensidade inicial, I_0 , é dirigida para os átomos do elemento a analisar. Ao incidir nestes átomos a sua intensidade é reduzida para o valor, I , devido à absorção (Gonçalves, 1990 *in* Brito, 2003). O feixe é então dirigido para um detector, onde a intensidade emergente (I) é medida. A comparação de I com I_0 , fornece o valor da radiação absorvida.

A absorvância e a concentração estão relacionadas pela lei de Lambert-Beer ⁽¹⁾, o que permite determinar a concentração dos metais nas amostras a analisar (Santos, 2005).

(1)

$$-\log T = -\log \frac{I}{I_0} = A = abc$$

em que, I – intensidade de radiação transmitida, I_0 – intensidade de radiação incidente, T – transmitância, A – absorvância, a – absorvidade, b – espessura do meio absorvente, c – concentração.

2.3. Validação do procedimento analítico

A validação do método analítico permite avaliar se o método é adequado para os trabalhos a realizar (Taylor, 1983, *in* Brito, 2003). Para assegurar a precisão e exactidão dos resultados obtidos, determinaram-se o limite de detecção e o erro de precisão do método.

2.3.1. Determinação do limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima medida, a partir da qual é possível detectar a presença do analito (Relacre, 2000).

Para o mercúrio utilizou-se o limite de detecção fornecido pelo fabricante do equipamento Milestone DMA 80, 0,02 ng de mercúrio.

Para o zinco utilizou-se o valor tabelado referente a amostras com a mesma matriz, 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Para os restantes metais o limite de detecção foi estimado de acordo com a média (\bar{X}) do sinal analítico dos brancos e o respectivo desvio padrão (σ).

$$LD = \bar{X} + 3 \sigma$$

Os limites de detecção para o Cd, Pb e Cu foram de 0,1; 0,7 e 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente.

2.3.2. Determinação do erro de precisão

O erro de precisão foi calculado através da equação:

$$E = 100 \times \sigma_m \times t / \bar{x}$$

em que $\sigma_m = \sigma / \sqrt{n}$, \bar{x} corresponde à média aritmética e t ao parâmetro t-Student para (n-1) graus de liberdade e para um grau de confiança de 95%. Os erros para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn foram de 5, 1, 2, 8 e 1%, respectivamente.

O procedimento analítico a utilizar foi testado através da análise de material de referência certificado, DORM-2 (músculo de peixe), DOLT-2 (fígado de peixe), BCR 278 (mexilhão) e NBS1566a (ostra). A Tabela 2 apresenta os valores certificados e os valores obtidos para os metais estudados nestes padrões.

Tabela 2 - Média e desvio padrão das concentrações certificadas e dos valores obtidos para os metais Cd, Pb, Hg, Cu e Zn do material de referência.

Padrões		Cádmio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Mercúrio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
DORM-2	Certificado	0,043 \pm 0,008	0,065 \pm 0,007	4,54 \pm 0,26	2,34 \pm 0,16	25,6 \pm 2,3
	Obtido	0,035	0,062	4,25	1,08	23
DOLT-2	Certificado	20,8 \pm 0,5	0,22 \pm 0,02	1,99 \pm 0,10	25,8 \pm 1,1	85,8 \pm 2,5
	Obtido	12,31	0,20	2,07	7,67	86
BCR 278	Certificado	0,34 \pm 0,02	1,91 \pm 0,04	0,188 \pm 0,007	9,60 \pm 0,16	76 \pm 2
	Obtido	0,33	1,07	0,185	3,15	75
NBS 1566a	Certificado	4,15 \pm 0,38	0,371 \pm 0,014	0,0642 \pm 0,0067	66,3 \pm 4,3	830 \pm 57
	Obtido	4,37	0,328	0,071	17,45	727

As concentrações dos metais nos padrões obtidas em laboratório estavam, de um modo geral, dentro do limite fornecido. Assim admitiu-se que a solubilização das amostras dos organismos estudados foi efectiva e a sua análise credível. A excepção foi a determinação de Cu em todos os materiais de referência certificados.

3.Obtenção de informação sobre variáveis ambientais

A consulta às bases de dados Gridded Climatologies e do SNIRH permitiram obter informação sobre temperatura em profundidade e sobre o caudal do rio Douro, respectivamente. Esta informação possibilita uma melhor interpretação dos resultados obtidos no doseamento dos metais analisados.

4.Tratamento de resultados

Para o tratamento estatístico dos dados, teste de análise de variância ANOVA, teste de Tukey, correlação e realização de gráficos foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 e STATISTICA 8.

CAPÍTULO III

Resultados

1. Resultados das análises

As amostras de *Spisula solida* foram analisadas relativamente ao teor de cádmio, chumbo, mercúrio, cobre e zinco. Os dados obtidos devem ser interpretados com cautela, uma vez que apenas a Aguda teve amostras frequentes, ao contrário da Torreira e da Foz do Douro que apenas foram amostradas em dois e três meses respectivamente. Os resultados obtidos nas amostras analisadas encontram-se em Anexo (Tabela 7).

Cádmio

Os valores obtidos para a concentração média mensal de Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nas amostras de *Spisula solida* provenientes da Aguda estão representados na figura 3.

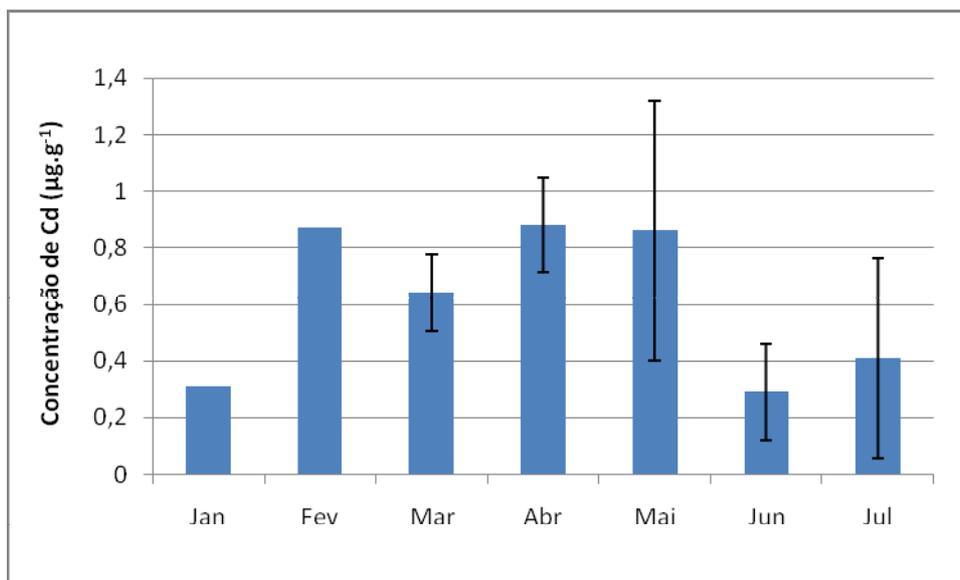


Figura 3 - Representação gráfica da concentração média mensal de cádmio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

As análises efectuadas não revelaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 2,22$; $p = 0,16$). Pela análise da figura 3 verifica-se um aumento da concentração de Cd de Janeiro para Fevereiro sendo que até Maio registaram-se os valores mais elevados. Em Junho e Julho houve uma diminuição da concentração média de Cd para valores semelhantes aos registados no início do ano.

Na figura 4 estão representados os valores obtidos para a concentração média mensal de Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos diferentes locais de amostragem, entre Janeiro e Julho de 2009, sendo que não se verificaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 0,14$; $p = 0,87$). A concentração de Cd aumenta de Janeiro para Fevereiro, quer na Torreira quer na Aguda. Na Foz do Douro a concentração de Cd é a menor em Fevereiro mas em Março atinge o valor mais elevado registado nos diversos locais ($1,27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

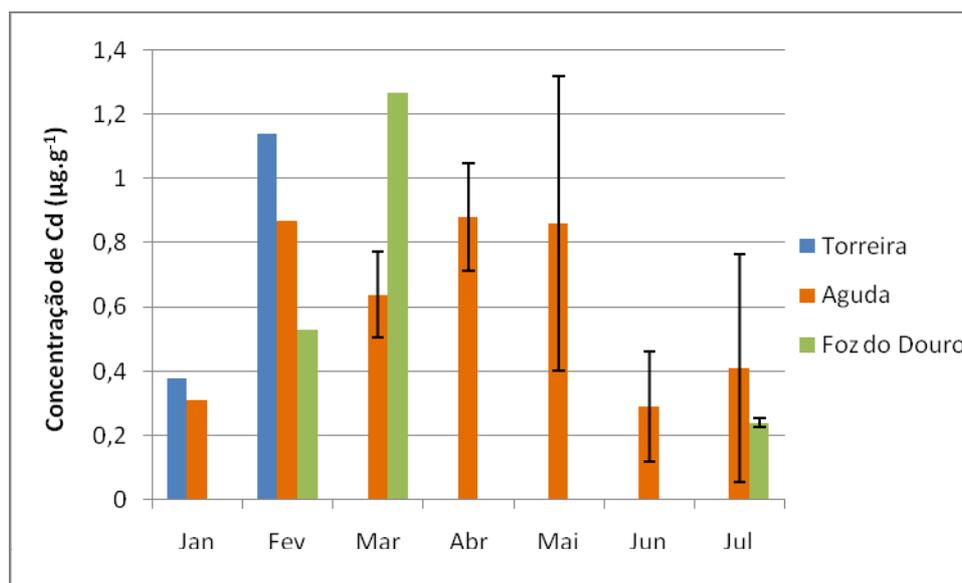


Figura 4 - Representação gráfica da concentração média mensal de cádmio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Chumbo

A figura 5 representa os valores obtidos para a concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem.

A análise efectuada não revelou diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 1,63$; $p = 0,27$). A concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) não variou muito nos meses analisados, com excepção dos meses de Março e Abril onde se verificou um pico concentração de chumbo com 1,5 e $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente.

Esta variação indicia uma tendência para uma variação sazonal. No entanto esta variação não é estatisticamente confirmada, provavelmente devido ao reduzido número de amostras.

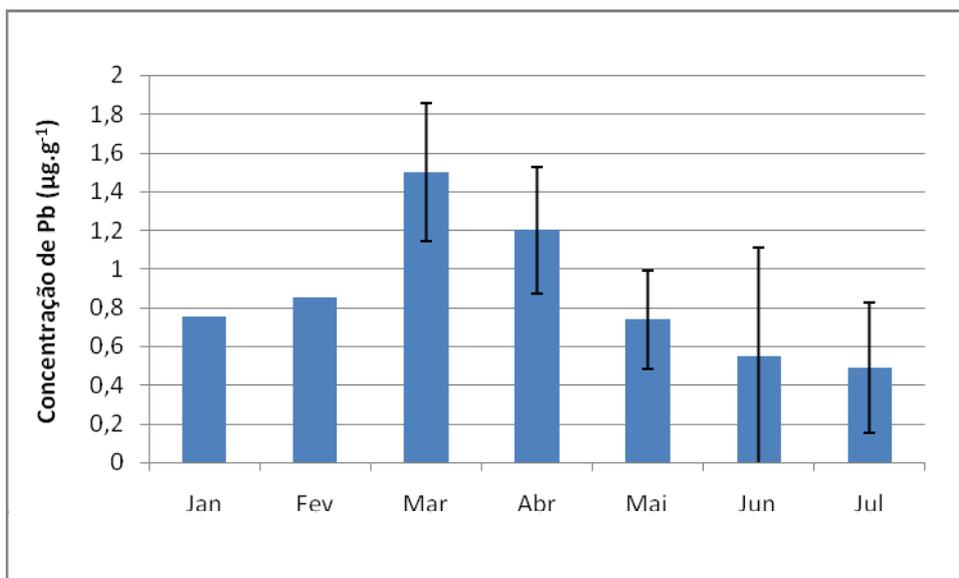


Figura 5 - Representação gráfica da concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Os valores registados para a concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos diferentes locais de amostragem estão representados na figura 6. Não se verificaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 0,05$; $p = 0,96$).

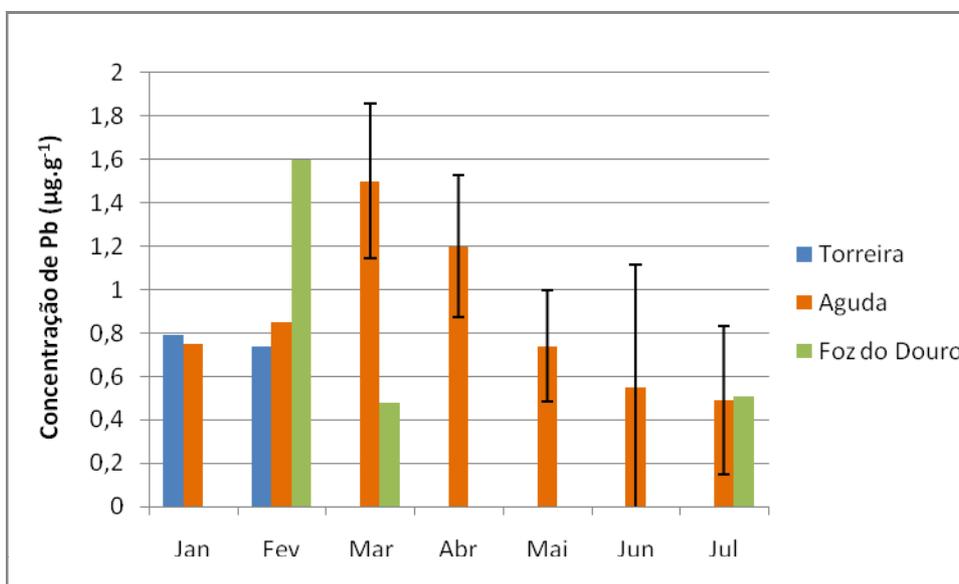


Figura 6 - Representação gráfica da concentração média mensal de chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Nos meses iniciais a concentração de chumbo registada na Torreira e na Aguda foi aproximada, sendo que na Foz do Douro o mês de Fevereiro foi quando se registou o valor mais elevado do período de amostragem com $1,6 \mu\text{g.g}^{-1}$. No mês seguinte verificou-se uma diminuição da concentração média de chumbo na Foz do Douro, enquanto na Aguda atingiu o valor máximo registado com $1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ e nos meses seguintes a concentração de chumbo foi diminuindo. No final do período de amostragem os valores na Aguda e na Foz do Douro foram semelhantes.

O facto de apenas existirem dados da Torreira em Janeiro e Fevereiro impede-nos de verificar se teria a mesma tendência registada na Aguda, o que seria interessante pois nos meses iniciais apresentam valores muito semelhantes.

Mercúrio

Na figura 7 encontram-se representados os valores obtidos para a concentração média mensal de mercúrio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nas amostras de indivíduos provenientes da Aguda ao longo do período de amostragem.

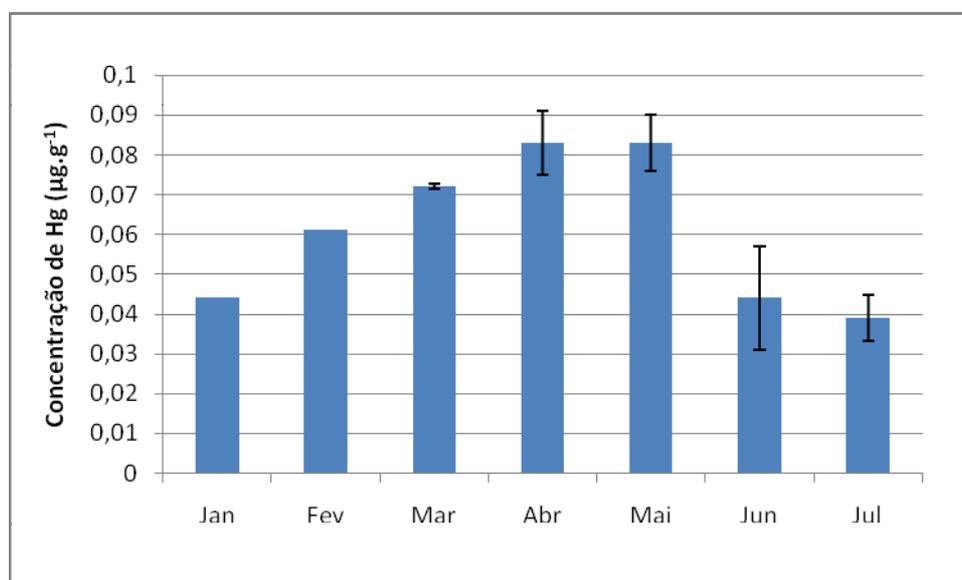


Figura 7 - Representação gráfica da concentração média mensal de mercúrio ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

As análises efectuadas revelaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 10,0$; $p = 0,004$) ao longo do período de amostragem. Os valores da concentração média de mercúrio aumentaram progressivamente entre Janeiro e Abril,

onde se registou uma concentração máxima de $0,083 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, um valor igual ao que se verificou em Maio. Em Junho e Julho a concentração média diminuiu para valores semelhantes aos registados em Janeiro. Através do teste de Tukey procuraram-se diferenças significativas entre o conjunto de amostras mensais, tendo-se verificado diferenças significativas entre Março e Julho, Abril e Junho, Abril e Julho, Maio e Junho e entre Maio e Julho (Anexos, tabela 5), o que indica que a concentração média mensal de mercúrio nos meses de Primavera é significativamente superior à concentração verificada no Verão.

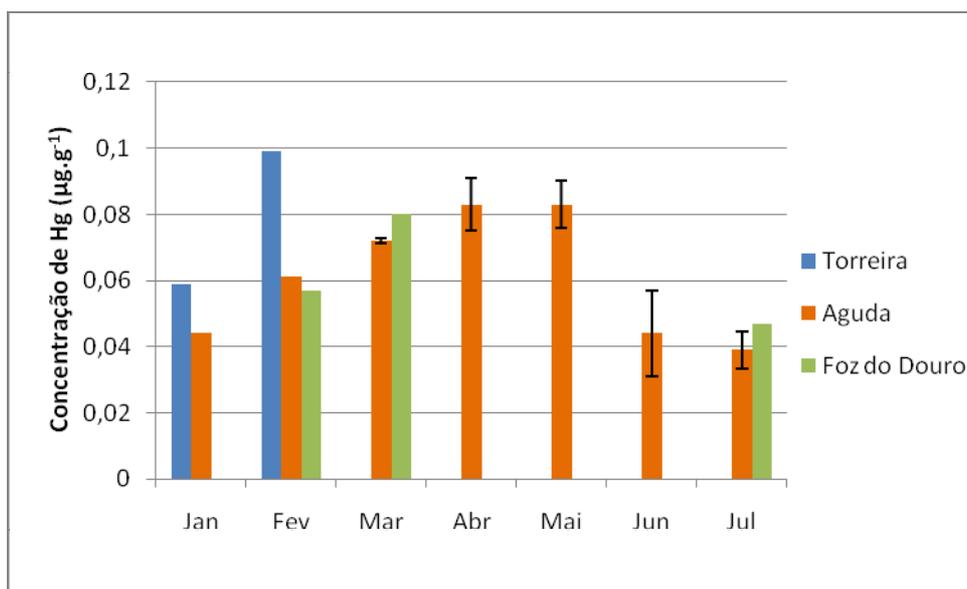


Figura 8 - Representação gráfica da concentração média mensal de mercúrio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Na figura 8 encontram-se representados os resultados obtidos para a concentração média de mercúrio em cada local de amostragem ao longo do período de amostragem, sendo que não se verificaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 0,69$; $p = 0,53$). Pela análise da figura 10 observa-se que a variação da concentração média de mercúrio foi semelhante nos diferentes locais ao longo do período de amostragem, ou seja, registaram-se valores mais elevados entre Fevereiro e Maio comparativamente aos restantes meses em todos os locais.

Cobre

A figura 9 representa os valores obtidos para a concentração média mensal de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 4,19$; $p = 0,05$).

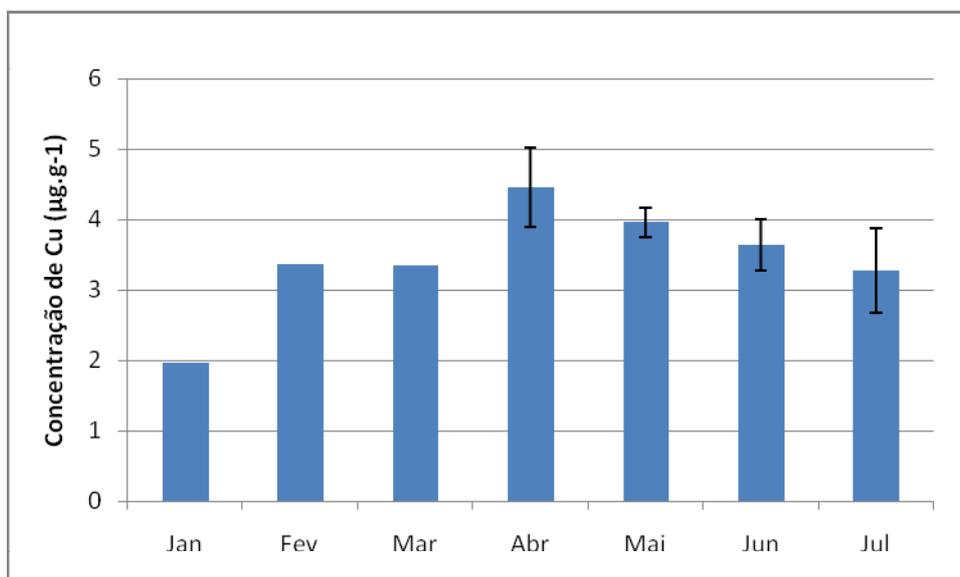


Figura 9 - Representação gráfica da concentração média mensal de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

A análise da figura 9 permite verificar que o valor mais elevado registou-se em Abril com $4,46 \mu\text{g.g}^{-1}$. Nos restantes meses a concentração média de Cu foi inferior ($[\text{Cu}] < 3,96 \mu\text{g.g}^{-1}$), tendo o valor mais baixo sido registado em Janeiro ($1,97 \mu\text{g.g}^{-1}$).

Na figura 10 estão representados os valores obtidos para a concentração média mensal de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) nos diferentes locais de amostragem, sendo que as diferenças verificadas não são significativas entre os valores médios mensais ($F = 2,34$; $p = 0,15$).

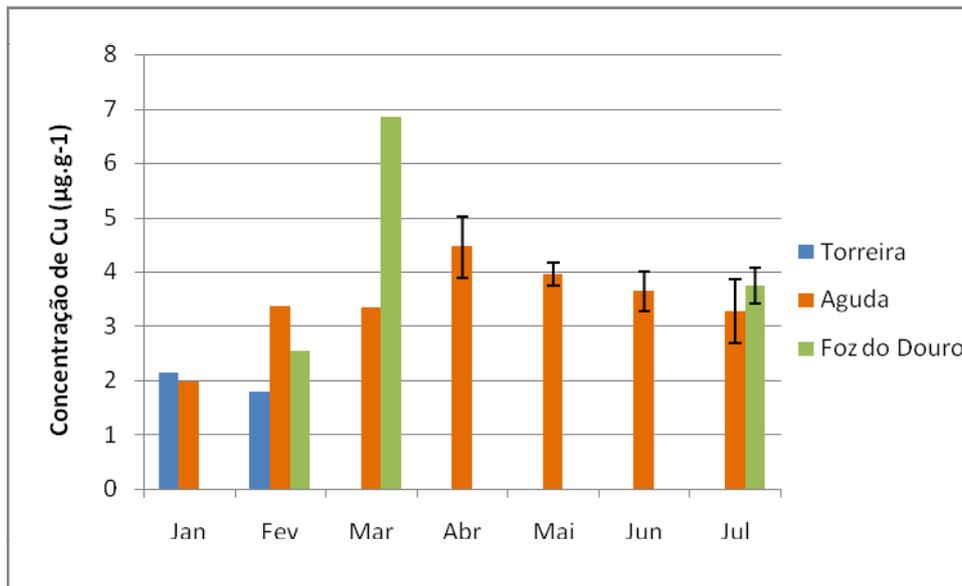


Figura 10 - Representação gráfica da concentração média mensal de cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Pela análise da figura 10 conclui-se que a concentração média mensal de Cu na Torreira e na Aguda apresentam valores semelhantes em Janeiro mas em Fevereiro a concentração de Cu aumenta na Aguda, enquanto na Torreira diminui ligeiramente. O aumento da concentração média de Cu verificado entre Fevereiro e Março na Aguda também ocorreu na Foz do Douro.

Zinco

Os valores obtidos para a concentração média mensal de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nas amostras de *Spisula solida* provenientes da Aguda entre Janeiro e Julho de 2009 estão representados na figura 11. As análises revelaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 10,8$; $p = 0,003$) ao longo do período de amostragem.

Pela análise da figura 11 verifica-se que após se registarem valores semelhantes entre Janeiro e Março a concentração média de zinco atingiu um pico em Abril ($57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e Maio ($58 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Nos meses seguintes os valores desceram para níveis ligeiramente inferiores aos verificados nos meses iniciais do ano, tendo o valor mais baixo sido registado em Julho ($43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

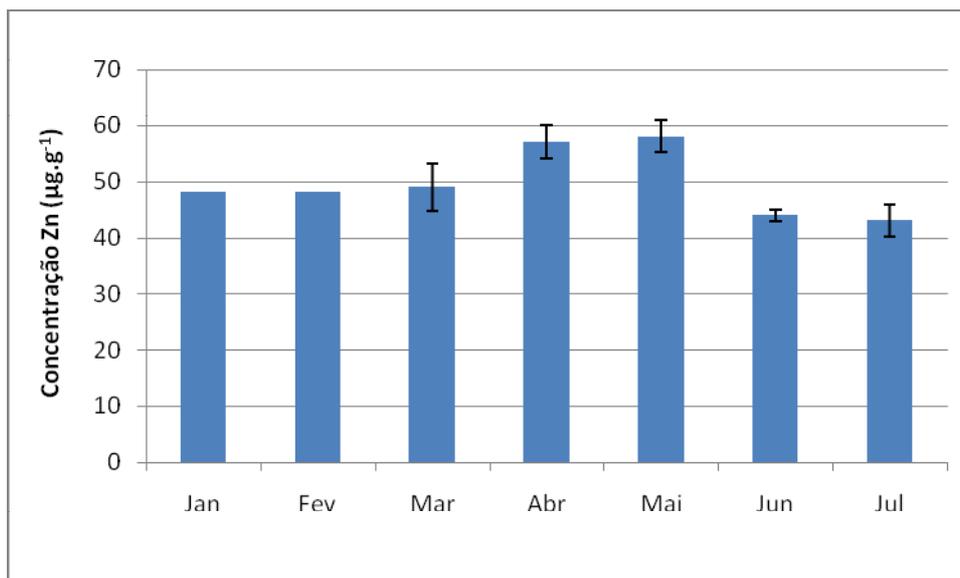


Figura 11 - Representação gráfica da concentração média mensal de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) na Aguda ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Através do teste de Tukey procuraram-se diferenças significativas entre os vários pares de amostras mensais, tendo-se verificado diferenças significativas entre Abril e Junho, Abril e Julho, Maio e Junho e entre Maio e Julho (Anexos, tabela 6), o que indica que a concentração média mensal de mercúrio nos meses de Primavera é significativamente superior à concentração verificada no Verão.

Na figura 12 estão representados os valores obtidos para a concentração média de zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (peso seco) em cada local de amostragem ao longo do período de amostragem, sendo que não se verificaram diferenças significativas entre os valores médios mensais ($F = 0,63$; $p = 0,55$).

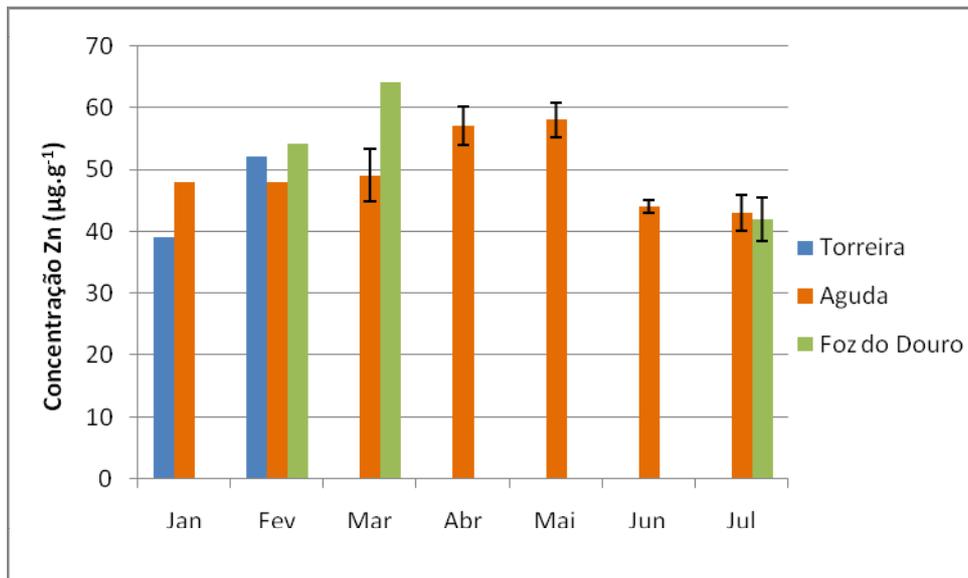


Figura 12 - Representação gráfica da concentração média mensal de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso seco) nos locais de amostragem ao longo do período de amostragem. As barras de erro representam o desvio padrão.

Pode-se verificar que os valores variam de forma semelhante nos diferentes locais, tendo-se registado os valores mais elevados entre Fevereiro e Maio, sendo que em Junho e Julho verifica-se uma diminuição para valores semelhantes aos registados no mês de Janeiro.

Comparação com limites legais

Os níveis de cádmio, chumbo e mercúrio obtidos nas amostras de *Spisula solida* encontram-se abaixo do limite estabelecido para consumo humano (Regulamento Comunitário (CE) nº 466/2001). Os limites são $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o cádmio, $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o chumbo e $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o mercúrio, em peso húmido (Figura 13).

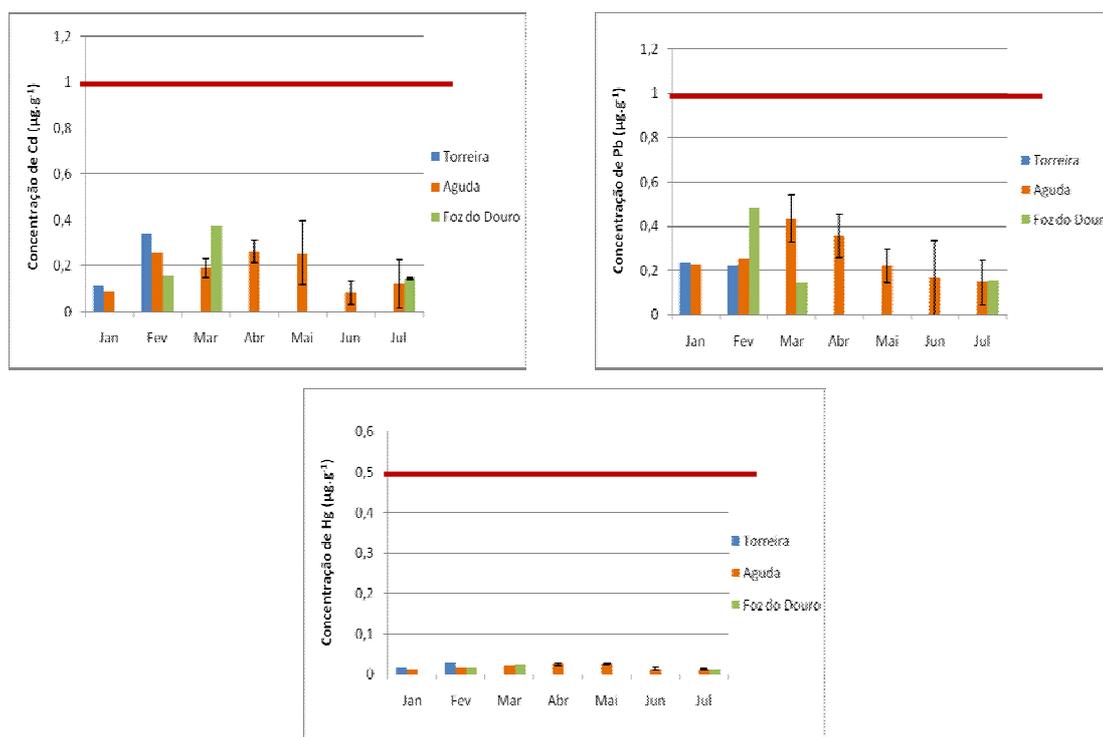


Figura 13 - Concentrações de Cd, Pb e Hg ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (peso húmido) nas amostras analisadas. A linha representa os limites admissíveis pela legislação em vigor (Regulamento Comunitário (CE) nº 466/2001).

2.Comparação com dados ambientais e fisiológicos

Os resultados obtidos nas análises foram comparados com dados ambientais e fisiológicos de modo a encontrar um ou mais factores que possam ter influência na variação da concentração obtida para os diferentes metais.

Temperatura

Para os dados da temperatura (Gridded Climatologies, 2002) escolheram-se os dados a 30 metros de profundidade pois é a essa profundidade que, geralmente, se encontra a espécie estudada. Apenas se utilizou os dados de um local, neste caso da Aguda, pois a temperatura nos três locais de amostragem é sensivelmente a mesma, apenas varia uma décima de grau.

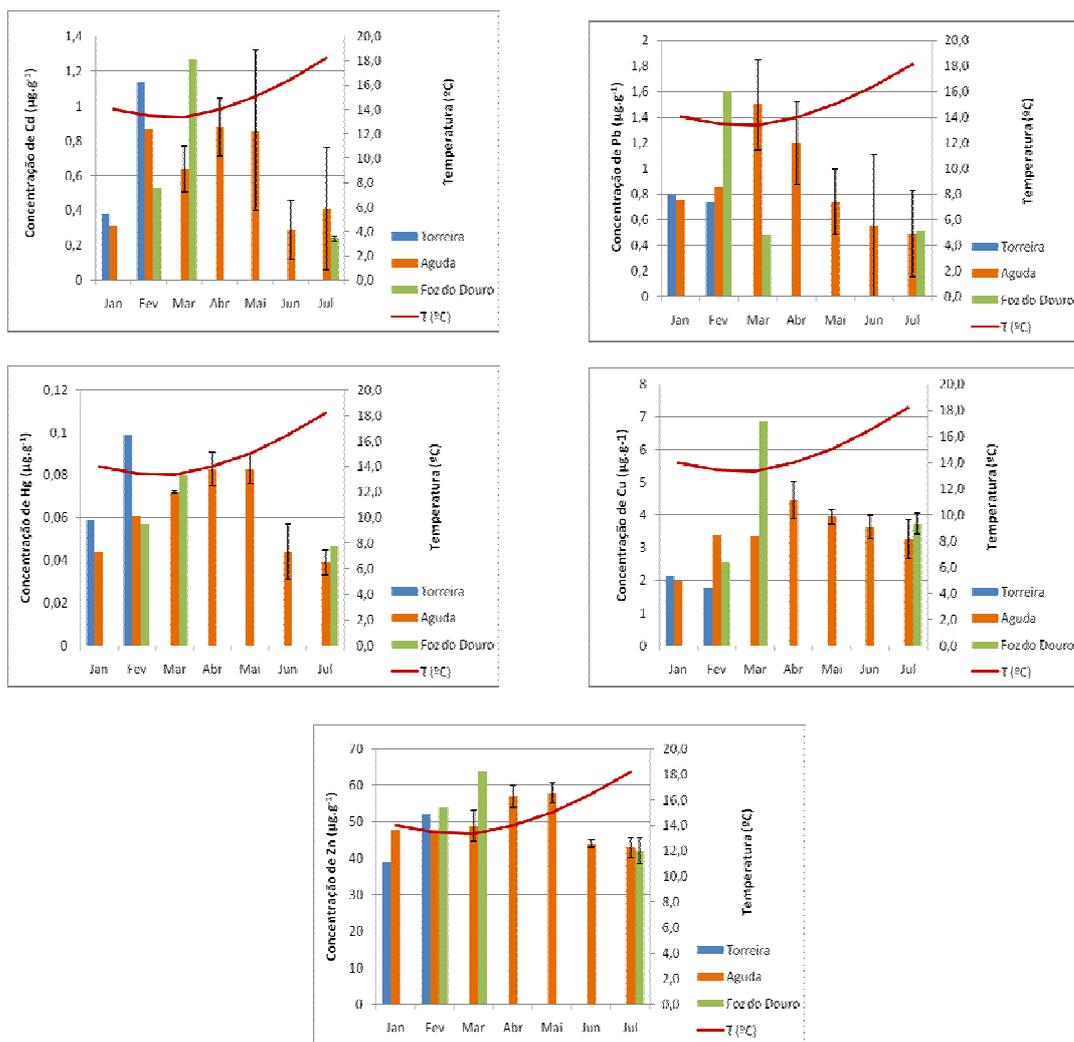


Figura 14 - Representação gráfica da relação entre a concentração obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco) e a temperatura a 30 metros de profundidade ($^{\circ}\text{C}$).

A comparação dos resultados obtidos com a temperatura a 30 metros de profundidade de profundidade (Figura 14) permite verificar que este parâmetro parece ter influência na variação da concentração dos metais na *Spisula solida*, sendo a sua relação inversa.

Para o Cd, o coeficiente de correlação $r = -0,52$ ($p = 0,0002$), para o Pb $r = -0,75$ ($p = 0,0001$), para o Hg $r = -0,59$ ($p = 0,0004$), para o Cu $r = 0,06$ ($p = 0,0106$) e para o Zn $r = -0,50$ ($p = 0,0124$).

Caudal do rio Douro

Os resultados obtidos nas análises de *Spisula solida* foram comparados com os dados do caudal médio mensal (SNIRH, 2009) do rio Douro. Os caudais dos rios podem influenciar a disponibilidade ambiental dos metais através do transporte desses contaminantes desde áreas agrícolas e/ou industriais.

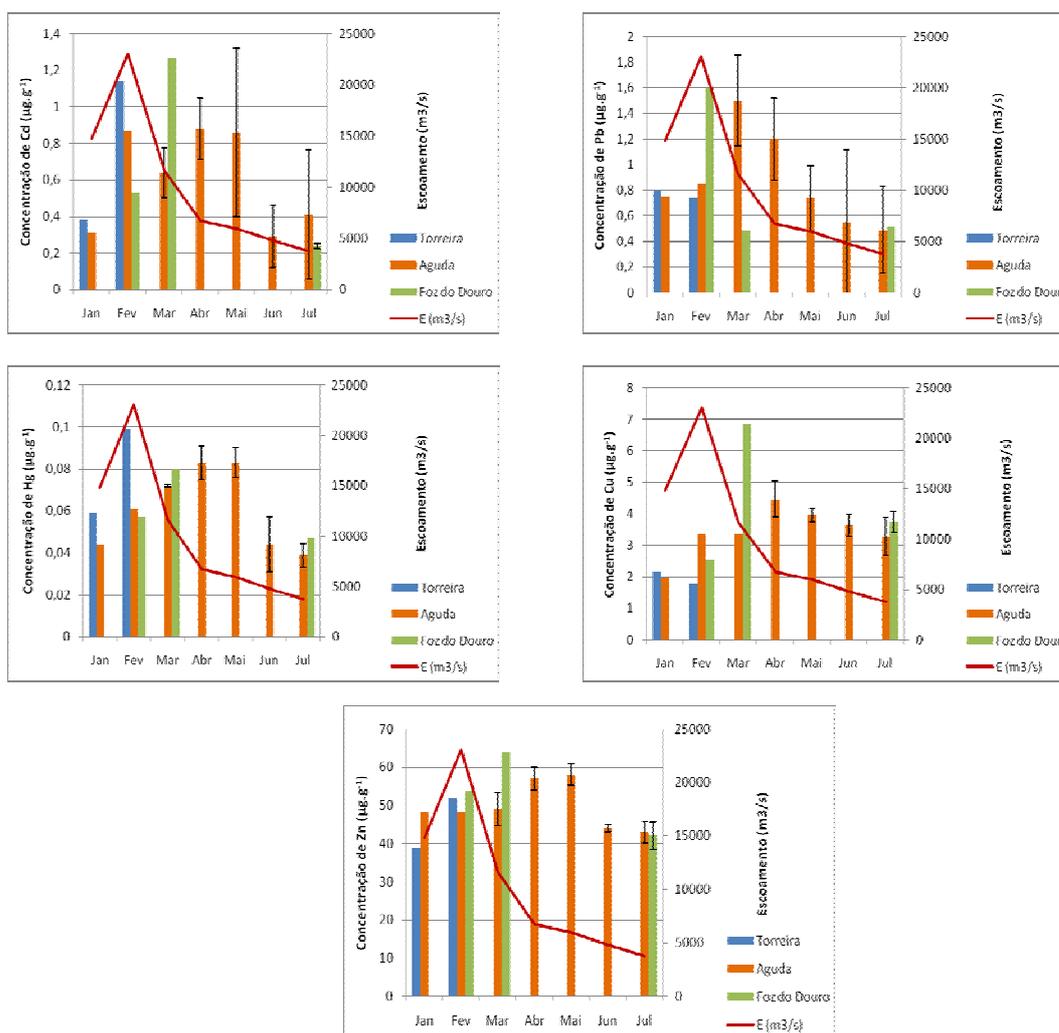


Figura 15 - Representação gráfica da relação entre a concentração obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$, peso seco) e o caudal médio mensal do rio Douro (m^3/s).

Pela análise da figura 15 verifica-se que no caso deste trabalho o caudal do rio Douro não parece ter influência na variação da concentração obtida para os metais na *Spisula solida*.

Para o Cd, o coeficiente de correlação $r = 0,27$ ($p = 0,46$), para o Pb $r = 0,24$ ($p = 0,47$), para o Hg $r = 0,003$ ($p = 0,38$), para o Cu $r = -0,42$ ($p = 0,13$) e para o Zn $r = -0,07$ ($p = 0,61$).

Dados fisiológicos

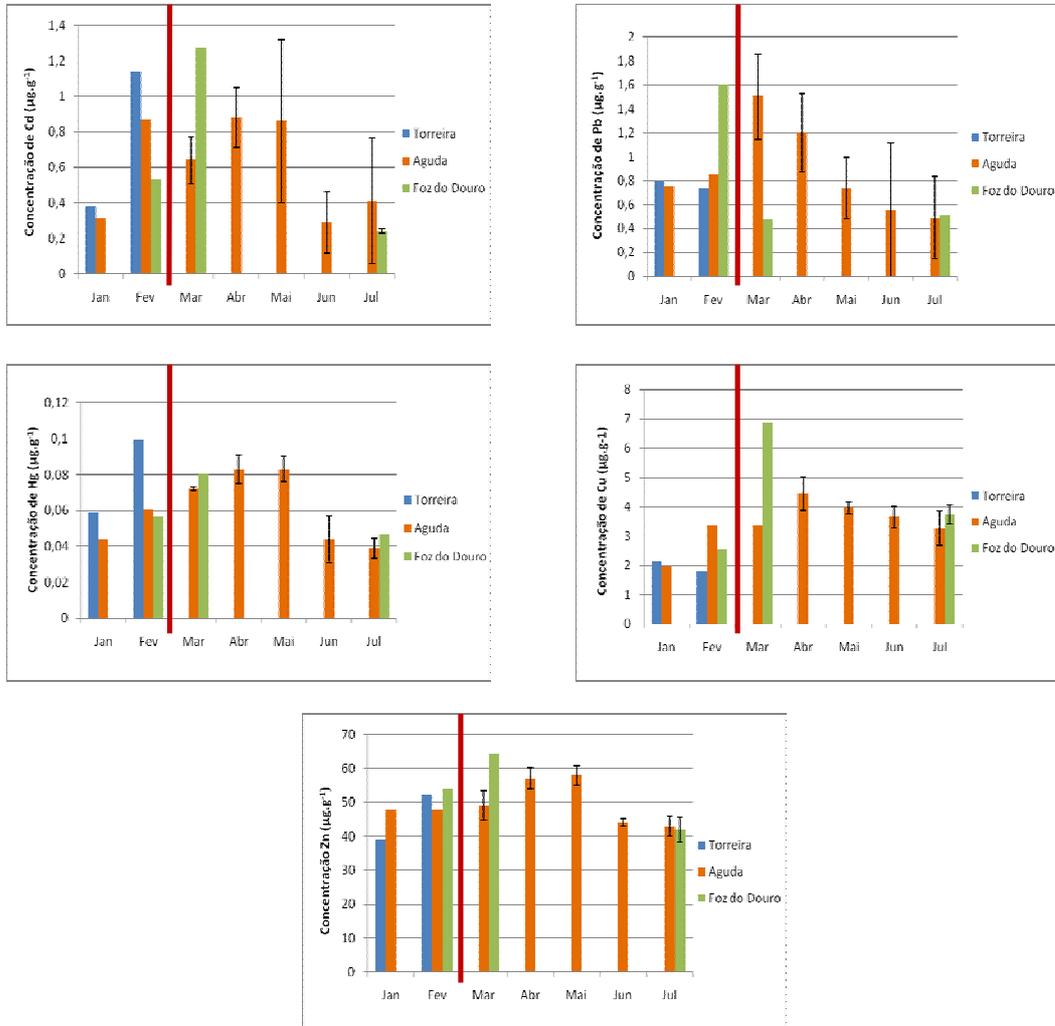


Figura 16 - Representação gráfica da relação entre a concentração obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn ($\mu\text{g.g}^{-1}$, peso seco) e a época de postura. A linha representa o início do período de postura.

O período de postura da *Spisula solida* ocorre em Março (INIAP, 2003) e analisando a figura 16 verifica-se que é a partir dessa altura que se registam as concentrações mais elevadas dos metais analisados. A relação entre este factor e a concentração dos metais parece ser mais evidente para o chumbo, mercúrio e cobre.

CAPÍTULO IV

Discussão Geral

Discussão geral

Determinou-se neste trabalho a concentração de cádmio, chumbo, mercúrio, cobre e zinco em amostras de *Spisula solida* recolhidas na costa Norte de Portugal Continental, sendo a concentração registada em todas as amostras inferior ao limite estabelecido para consumo humano (Regulamento Comunitário (CE) nº 466/2001).

Apenas os metais mercúrio e zinco apresentaram diferenças significativas para os valores médios mensais, ao longo do período de amostragem. No entanto, atendendo à representação gráfica para os restantes metais, seria de esperar que o cádmio, chumbo e cobre também apresentassem diferenças estatisticamente significativas. Tal não aconteceu, provavelmente, devido ao reduzido número de amostras realizadas.

Os metais analisados (Cd, Pb, Hg, Cu e Zn) registaram os valores mais elevados entre Fevereiro/Março e Maio. Este período onde se registou este aumento da concentração coincide com o período de postura (Figura 16), época em que ocorrem alterações fisiológicas nos organismos que potenciam a acumulação de uma maior quantidade de metais.

A comparação dos resultados obtidos com dados ambientais permitiu identificar a temperatura como um factor que parece influenciar a variação da concentração dos metais. Entre este parâmetro e a concentração média mensal obtida para o Cd, Pb, Hg, Cu e Zn existe uma relação inversa, com o aumento da temperatura a concentração dos metais é menor (Figura 14). Provavelmente a relação da temperatura com a variação da concentração dos metais não é directa, isto é, influencia o metabolismo o que potencia a bioacumulação de metais na *Spisula solida*.

A análise da correlação entre os dados do caudal médio mensal do rio Douro e a concentração de metais não indicia uma relação entre estas variáveis (Figura 15). No entanto, os valores máximos para o caudal mensal do Douro verificaram-se no mês de Fevereiro, o que coincide com o período de amostragem onde se registaram as concentrações médias mais elevadas para os metais analisados, o que permite antever que uma análise efectuada com mais dados de base possa revelar maior correlação. O

que não fica esclarecido é se o aumento da concentração se deverá a uma maior disponibilidade dos metais no meio, o que ocorre com o aumento do caudal do Douro.

A variação sazonal, no período Inverno/Primavera - Verão, é mais acentuada para uns metais que para outros. Esta variação parece reflectir um aumento da disponibilidade desses metais durante esse período.

O zinco apresenta os valores mais elevados entre os metais analisados, o que está de acordo com estudos anteriores (Caetano e Vale, 2003; Brito, 2003) que referem uma elevada concentração de zinco nas águas costeiras de Portugal Continental.

O cobre apresenta valores similares durante o período de amostragem, com excepção do mês de Março onde ocorre um pico da concentração deste metal. Este facto pode estar relacionado com o facto de apenas terem sido recolhidas duas amostras nesse mês e uma delas apresentar um valor muito superior, $18,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ na primeira amostra e apenas $3,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ na segunda amostra. Devido a esta diferença de valores optou-se pela exclusão do valor mais elevado, pois não é credível que existam tais variações entre amostras do mesmo mês, devendo ser um erro de análise.

O chumbo regista o valor mais elevado, para a concentração média mensal, na Foz do Douro ($1,6 \mu\text{g.g}^{-1}$), o que se poderá explicar pelo facto de ser o local amostrado mais próximo do Porto de Leixões que é um local potencialmente poluente.

O zinco e o cobre apresentaram teores mais elevados que os restantes metais (Cd, Pb e Hg). Esta diferença está associada à maior retenção de Zn e Cu que desempenham funções essenciais no metabolismo da amêijoia-branca e à maior disponibilidade ambiental destes metais.

Na Tabela 3 são apresentados níveis de metais obtidos em diversos estudos para diferentes espécies de bivalves, *Tapes decussatus*, *Crassostrea rhizophorae* e *Spisula subtruncata*.

As diferenças entre os trabalhos de Artígues-Lopez, *et al.*, (1989), Vyncke, *et al.*, (1999) e Gonçalves, *et al.*, (2007) e o presente trabalho poderão estar relacionadas com a espécie e com o local de origem das amostras analisadas, uma vez que os bivalves são organismos sedentários e como tal reflectem os teores do ambiente que habitam. Apesar de não ser legítimo efectuar comparações entre espécies no que respeita à concentração de metais, verificamos que os valores obtidos neste trabalho para as concentrações dos

metais analisados são, de um modo geral, inferiores às registadas noutros locais para outros bivalves (Atlântico Norte, Mediterrâneo, estuários).

Tabela 3 - Níveis médios da concentração de Cd, Pb, Hg, Cu e Zn, em diferentes espécies de bivalves capturadas em diferentes locais, retiradas da bibliografia indicada.

Espécie	Cd	Pb	Hg	Cu	Zn	Local	Fonte
<i>Tapes decussatus</i>	0,85 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco)	0,25 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco)	0,95 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco)	-	-	Estuário de Huelva	Artígues-Lopez, <i>et al.</i> , (1989)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	5,37 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco)	-	-	18,49 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco)	1180 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco)	Estuário dos rios Cocó e Ceará	Gonçalves, <i>et al.</i> , (2007)
<i>Spisula subtruncata</i>	0,08 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso húmido)	0,38 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso húmido)	0,02 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso húmido)	2,5 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso húmido)	1,27 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso húmido)	Atlântico Norte	Vyncke, <i>et al.</i> , (1999)

O número de amostras inicialmente previstas não pôde ser cumprido, umas vezes devido às condições meteorológicas adversas que impediram a saída dos barcos de pesca e outras devido às opções comerciais dos pescadores que deixaram de efectuar pescas nos locais inicialmente previstos, o que condicionou a obtenção do número de amostras desejado.

Este facto impediu que o objectivo inicialmente proposto de comparar a concentração dos metais nos diferentes locais fosse cumprido, pois não existem amostras nem em número suficiente nem com a frequência desejada de modo a suportar tal comparação.

A poluição por metais pesados afecta vários organismos, nomeadamente os aquáticos. A amêijoia-branca é um organismo com elevado interesse económico na zona Norte de Portugal e a determinação da concentração de metais pesados nesta espécie é um ponto de partida para que no futuro se desenvolvam estudos mais aprofundados sobre este tema.

Considerando que o número de amostras inicialmente previstas não pôde ser cumprido deveriam ser realizados estudos mais aprofundados envolvendo um maior número de amostras, abrangendo uma maior área de amostragem, de forma a determinar possíveis focos de poluição.

De um modo geral, revela-se de grande importância a realização de estudos envolvendo metais pesados nesta espécie de bivalves cuja exploração continua a ser um recurso rentável.

CAPÍTULO V

Conclusões

Conclusões

A realização deste trabalho permitiu tirar as seguintes conclusões:

- Todos os metais analisados aparentam uma variação sazonal (Inverno/Primavera – Verão) mas apenas para o mercúrio e zinco essa variação é estatisticamente significativa, sendo mais baixa no Verão;
- A temperatura é um dado ambiental que parece afectar a concentração dos metais pois apresenta uma relação inversa, isto é, com o aumento da temperatura a concentração obtida é menor, provavelmente devido a alterações no metabolismo da *Spisula solida* provocadas pela variação da temperatura;
- A fisiologia da *Spisula solida* é um factor que parece influenciar a variação da concentração dos metais, nomeadamente a época de reprodução coincide com os valores mais elevados;
- A capacidade de resposta à contaminação por metais deve ser melhor avaliada no sentido de determinar se *Spisula solida* reúne condições para ser utilizada como bioindicador de contaminação ambiental.

CAPÍTULO V

Bibliografía

Capítulo V – Bibliografia

Artígues-Lopez, M., Soria, M. L., Repetto, M. Heavy Metals in Bivalve Molluscs in the Huelva Estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (1989) **42**:634-642.

Borges, D. L. G., Curtius, A. J., Welz, B. e Heitmann, U. 2005. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. *Revista Analytica*. Agosto/Setembro. Nº18. Obtido em 20 de Outubro, em: http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed_anteriores/18/art02.pdf

Brito, J. (2003). *Repartição De Metais (Fe, Zn, Cu, Cd, Pb e Hg) No Polvo Octopus vulgaris Cuvier (1797) Na Costa Portuguesa*. Tese de mestrado em Ecologia, Gestão e Modelação de Recursos Marinhos, ramo de Ecologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 86 pp.

Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G. e Burt, G.R. (1985) *A guide to the assessment of heavy metal contamination in estuaries using biological indicators*. Occasional Publications. Marine Biological Association of the United Kingdom (**4**) 92pp. Acedido em 5 de Fevereiro de 2009, em: <http://www.mba.ac.uk/nmb/publications/occpub/occasionalpub4.htm>

Caetano, M. e Vale, C. (2003). Trace-elemental composition of seston and plankton along the portuguese coast. *Acta Oecologica*. (**24**) S341–S349.

Cairrão, E., Pereira, M. J., Pastorinho, M. R., Morgado, F., Soares, A. M. e Guilhermino, L. (2007). *Fucus spp.* as mercury contamination bioindicator in coastal áreas (Northwestern Portugal). *Bulletin Environmental Toxicology*. (**79**) 388-395.

Clark, R. (1997). *Marine Pollution*, Claredon Press, 4thEd., Inglaterra, 161 p.

Diniz, M. (2000). *Estudo da evolução de concentrações de metais (Cu, Cd e Zn) e de metalotionina em Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) transplantados para o Estuário do Rio Tejo*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 118 pp.

Fant , M.; Nyman, M.; Helle, E. e Rudback, E. (2001). Mercury, Cadmium, Lead and Selenium in ringed seals (*Phoca hispida*) from the Baltic Sea and from Svalbard. *Environmental Pollution*. **(111)** 493-501.

Förstner, V. e Wittmann, G. (1981). *Metal pollution in the aquatic environment*. 2ª Ed. Springer-Verlag, EUA. 486 p.

Gaspar, M.B. e Monteiro, C.C., (1999). Gametogenesis and spawning in the subtidal white clam *Spisula solida*, in relation to temperature. *Journal of the Marine Biological Association*, UK. **(79)** 753-755.

Gaspar, M. B., Santos, M. N., Sobral, M., Chicharo, L., Chicharo, A. e Monteiro, C., (2002). Influence of mesh size and tooth spacing on the proportion of damaged organisms in the catches of the portuguese clam dredge fishery. *ICES Journal of Marine Science* **59** (6): 1228-1236.

Gonçalves, R. S. L., Freire, G. S. S., Net, V. A. N. 2007. Determinação das concentrações de cádmio, cobre, cromo e zinco, na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Cocó e Ceará. *Revista de Geologia*, Vol. 20, nº 1, 57-63.

Gridded Climatologies - *Vertical Profiles - Results Mediterranean monthly MEDATLAS climatology 2002 (0-4000m)*. Obtido em 5 de Novembro de 2009, em: http://www.ifremer.fr/sismer/references/climatologies/param-profil.cgi?Clim=Medatlas0.2x0.2&Annee=2002_Mediterranee&Time=mois_month&Lang=a

Goksu, M.Z.L., Akar, M., Cevit, F. e Findik, O. (2005). Bioaccumulation of Some Heavy Metals (Cd, Fe, Zn, Cu) in Two Bivalvia Species (*Pinctada radiata* Leach, 1814 and *Brachidontes pharaonis* Fischer, 1870). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **(29)** 89-93. Acedido em 22 de Janeiro de 2009, em: <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-05-29-1/vet-29-1-15-0303-23.pdf>

Gonçalves, R. S. L. e Satander, G. (2007). Determinação das concentrações de cádmio, cobre e zinco na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Cocó e Ceará. *Revista de Geologia*, **20** (1): 57-63.

Hernandez - Hernandez, F., Medina, J., Ansuategui, J. e Conesa, M. (1990): Heavy metal concentrations in some marine organisms from the Mediterranean sea (Castellon, Spain): metal accumulation in different tissues. *Scientia Marina*, **54** (2): 113-129.

INIAP – Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas. 2003. Relatório de actividades do Ipimar. 68 pp.

Langston, W.J., Burt, G.R. e Pope, N.D. (1999). Bioavailability of metals in sediments of the Dogger Bank (Central North Sea): A mesocosm study. *Estuarine, coastal and shelf science*. **48** (5):519-540.

Manahan, S. (2000). *Environmental Chemistry*. 7ª edição. CRC Press LLC. Boca Raton.

MarBEF. (2008). *ERMS taxon details - Spisula solida (Linnaeus, 1758)*. Obtido em 14 de Março de 2009 de <http://www.marbef.org/data/aphia.php?p=taxdetails&id=140301>

MarLIN. (2007). *BIOTIC Species Information for Spisula solida*. Obtido em 23 de Março de 2009, de <http://www.marlin.ac.uk/biotic/browse.php?sp=4598>

NCCOS (NOAA's National Centers for Coastal Ocean Science). (2007). *Monitoring Data - Mussel Watch*. Obtido em 24 de Junho de 2009, de: http://www8.nos.noaa.gov/cit/nsandt/download/mw_monitoring.aspx

Pimenta, J. (2007). *Poderá Nassarius reticulatus (L.) ser usado como bioindicador da contaminação por mercúrio?*. Dissertação apresentada para obtenção de grau de mestre em Engenharia do Ambiente apresentada a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto. 80 pp.

Perttilä, M., Tervo, V. e Parmanne, R. (1982). Heavy metals in Baltic herring and cod. *Marine Pollution Bulletin*, **13**(11): 391-393.

Rashed, M.N. (sem data). *Biomarkers as indicator for water pollution with heavy metals in rivers, seas and oceans*. Acedido em 20 de Janeiro, em: <http://www.wrrc.dpri.kyoto> u.ac.jp/~aphw/APHW2004/proceedings/OHS/56-OHSA344/56-OHS-A344.pdf

Robards, K. e Worsfold, P. (1991). Cadmium: Toxicology and Analysis. *Analyst*, **116**: 549-568.

Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001. *Jornal Oficial da União Europeia* L77 de 16.3.2001, p. 7-12.

Relacre, Guia nº 13 – *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Relacre, Lisboa, 2000 (ISBN 972-8574-02-9).

Santo, S., P., E. (2008). *Determinação de metais pesados em Palaemon serratus capturados na costa Norte de Portugal*. Tese de mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente, ramo de Remediação Ambiental. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 36 pp.

Santos, M. A. 2005. Instituto Superior Técnico. *Guia dos Laboratórios - Determinação do cálcio em sumos por espectroscopia de absorção atómica*. 33 pp.

Seixas, F. (2008). *Análise de metais pesados em ruivo (Chelidonichthys lucernus, Linnaeus, 1758)*. Tese de mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente, ramo de Remediação Ambiental. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 56 pp.

Serafim, A., Company, R., Bebianno, M. J. 2005. *Concentração de metais em diversos organismos no estuário do rio Guadiana como indicador da qualidade da água*.

SNIRH (Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos) (2009). *Crestuma (EDP) – Hidrométrica*. Obtido em 5 de Outubro em: http://snirh.pt/snirh.php?main_id=2&item=3&pesquisador=crestuma

Teixeira, R. R., Simões, R. C., Brandão, J. M., Matos, W. N., Fontes, V. M. S. e Fernandez, L. G. (2007). Análise da capacidade de bioacumulação de metais pesados por quatro espécies de moluscos bivalves (*Anomalocardia Brasiliiana*, *Brachidontes Exustus*, *Iphigenia Brasiliiana*, *Crassostrea sp.*) da praia de Cabuçu (Saubára, Bahia). *Anais do VIII congresso de ecologia do Brasil*. Caxambu – MG, 23 a 28 de Setembro de 2007. Sociedade de Ecologia do Brasil. Brasil.

Timbrell, J. (1995). *Introduction to toxicology* (2a ed.). Inglaterra: Taylor&Francis.

Türkmen, A., Türkmen, M. e Tepe, Y. (2005). Biomonitoring of Heavy Metals from Iskenderun Bay Using Two Bivalve Species *Chama pacifica* Broderip, 1834 and *Ostrea stentina* Payraudeau, 1826. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **5** : 107-111. Acedido em 12 de Janeiro de 2009, em: http://www.trjfas.org/pdf/issue_5_2/107_111.pdf

Villarreal-Treviño, C.; Obregón-Morales, M.; Lozano-Morales, J. e Villegas-Navarro, A. (1986). Bioaccumulation of lead, copper, iron and zinc by fish in a transect of the Santa Catarina River in Cadereyta Jiménez, Nuevo León, México. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, **37**: 395-401.

Vyncke, W., Hillewaert, H., Guns, M. e van Hoeyweghen, P. (1999). Trace metals in cut trough shell (*Spisula subtruncata*) from Belgian coastal waters. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **16** (1):1-8.

WHO (World Health Organization). (1976). *Environmental Health Criteria - Mercury*. Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc001.htm>

WHO (World Health Organization). (1977). *Environmental Health Criteria - lead*. Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc003.htm#SectionNumber:2.1>

WHO (World Health Organization). (1989a). *Environmental Health Criteria – lead - environmental aspects*. Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc85.htm>

WHO (World Health Organization). (1989b). *Environmental Health Criteria - Mercury - environmental aspects*. Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc086.htm>

WHO (World Health Organization). (1992). *Environmental Health Criteria - Cadmium*. Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>

WHO (World Health Organization). (1992). *Environmental Health Criteria – Cadmium - environmental aspects*.

Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc135.htm>

WHO (World Health Organization). (1995). *Environmental Health Criteria - inorganic lead*. Obtido em 29 de Abril de 2008, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc165.htm>

WHO (World Health Organization). (1998). *Environmental Health Criteria – Copper*. Obtido em 12 de Maio de 2009, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>

WHO (World Health Organization). (2001a). *Environmental Health Criteria – Biotransformation*. Obtido a 20 de Junho em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc221.htm#4.3.2>

WHO (World Health Organization). (2001b). *Environmental Health Criteria – Zinc*. Obtido em 12 de Maio de 2009, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc221.htm#1.3>

ANEXOS

Tabela 4 - Características da ganchorra do norte

Boca da ganchorra	
Comprimento (cm)	200
Altura (cm)	30
Pente de dentes	
Número de dentes	49
Espaçamento entre dentes (cm)	3
Comprimento dos dentes (cm)	9
Saco de rede	
Comprimento (cm)	450
Malhagem (mm)	25
Grelha	
Espaçamento entre barras (cm)	-



Figura 17 - Ganchorra do norte, mostrando a boca e o respectivo saco de rede (Fonte: Ipimar)

Tabela 5 - Resultados do teste de Tukey realizado para o mercúrio ao conjunto de amostras mensais provenientes da Aguda

mercúrio obtida em cada amostra na Aguda		n	Mean	SE	Pooled SE	SD
Mar	2	0,0715	0,00050	0,00627	0,0007	
Abr	3	0,0830	0,00458	0,00512	0,0079	
Mai	2	0,0830	0,00500	0,00627	0,0071	
Jun	3	0,0440	0,00755	0,00512	0,0131	
Jul	2	0,0390	0,00400	0,00627	0,0057	

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
em cada amostra na Aguda	0,0044	4	0,0011	13,88	0,0019
Residual	0,0006	7	0,0001		
Total	0,0049	11			

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
Mar v Abr	-0,0115	-0,0405 to 0,0175	
Mar v Mai	-0,0115	-0,0432 to 0,0202	
Mar v Jun	0,0275	-0,0015 to 0,0565	
Mar v Jul	0,0325	0,0008 to 0,0642	(significant)
Abr v Mai	0,0000	-0,0290 to 0,0290	
Abr v Jun	0,0390	0,0131 to 0,0649	(significant)
Abr v Jul	0,0440	0,0150 to 0,0730	(significant)
Mai v Jun	0,0390	0,0100 to 0,0680	(significant)
Mai v Jul	0,0440	0,0123 to 0,0757	(significant)
Jun v Jul	0,0050	-0,0240 to 0,0340	

Tabela 6 - Resultados do teste de Tukey realizado para o zinco ao conjunto de amostras mensais provenientes da Aguda

obtida em cada amostra na Aguda		n	Mean	SE	Pooled SE	SD
Mar	2	49,0	3,00	1,98	4,2	
Abr	3	57,3	1,76	1,61	3,1	
Mai	2	58,0	2,00	1,98	2,8	
Jun	3	44,0	0,58	1,61	1,0	
Jul	2	43,0	2,00	1,98	2,8	

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
em cada amostra na Aguda	496,0	4	124,0	15,88	0,0013
Residual	54,7	7	7,8		
Total	550,7	11			

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
Mar v Abr	-8,3	-17,5 to 0,8	
Mar v Mai	-9,0	-19,0 to 1,0	
Mar v Jun	5,0	-4,1 to 14,1	
Mar v Jul	6,0	-4,0 to 16,0	
Abr v Mai	-0,7	-9,8 to 8,5	
Abr v Jun	13,3	5,2 to 21,5	(significant)
Abr v Jul	14,3	5,2 to 23,5	(significant)
Mai v Jun	14,0	4,9 to 23,1	(significant)
Mai v Jul	15,0	5,0 to 25,0	(significant)
Jun v Jul	1,0	-8,1 to 10,1	

Tabela 7 – Resultados das concentrações dos metais Cd, Pb, Hg, Cu e Zn obtidos nas amostras analisadas

Amostra	Local	Data	[Cd] $\mu\text{g.g}^{-1}$	[Pb] $\mu\text{g.g}^{-1}$	[Hg] $\mu\text{g.g}^{-1}$	[Cu] $\mu\text{g.g}^{-1}$	[Zn] $\mu\text{g.g}^{-1}$
1	Torreira	12-Jan	0,38	0,79	0,059	2,15	39
2	Aguda	12-Jan	0,31	0,75	0,044	1,97	48
3	Aguda	17-Fev	0,87	0,85	0,061	3,37	48
4	Torreira	17-Fev	1,14	0,74	0,099	1,78	52
5	Foz	26-Fev	0,53	1,6	0,057	2,55	54
6	Aguda	17-Mar	0,54	1,7	0,072	18,1	46
7	Foz	23-Mar	1,27	0,48	0,080	6,85	64
8	Aguda	30-Mar	0,73	1,2	0,071	3,35	52
9	Aguda	01-Abr	1,01	0,85	0,074	5,01	58
10	Aguda	07-Abr	0,94	1,2	0,086	4,49	60
11	Aguda	21-Abr	0,69	1,5	0,089	3,88	54
12	Aguda	05-Mai	0,53	0,92	0,088	4,11	56
13	Aguda	13-Mai	1,18	0,56	0,078	3,81	60
14	Aguda	16-Jun	0,11	1,2	0,059	3,51	44
15	Aguda	22-Jun	0,45	0,23	0,035	3,37	45
16	Aguda	30-Jun	0,30	0,22	0,038	4,05	43
17	Foz	01-Jul	0,25	0,51	0,047	3,97	44
18	Aguda	08-Jul	0,16	0,73	0,043	3,70	45
19	Foz	14-Jul	0,23	0,51	0,047	3,50	39
20	Aguda	21-Jul	0,66	0,25	0,035	2,86	41