

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente

**Qualidade de Bivalves Estuarinos Explorados Para Consumo**

**Potencial risco para a espécie *Ruditapes decussatus*: Um estudo de caso**

Sara Neusa Monteiro de Alcântara Carreira

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Ecológica.

Orientador(a): Professora Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da Costa

Lisboa

2011



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer á professora Maria Helena Costa, por todo o apoio e disponibilidade demonstrada para a orientação do presente trabalho. Um agradecimento muito especial para o Pedro Costa, com quem tanto aprendi e que esteve incondicionalmente presente em todos os momentos para me apoiar, esclarecer e aconselhar durante todo o processo. Agradeço ao Jorge Lobo Arteaga pelo apoio e disponibilidade demonstrados, á professora Sandra Caeiro pela cooperação e ao Miguel Caetano do IPIMAR pela informação fornecida. Agradeço á minha colega e amiga Joana Antunes por todo o apoio e companheirismo demonstrados e aos meus amigos André Amaro, Diogo Morato, Filipa Ferro, Filipe Rolo, Inês Martins, Mariana Corrêa, Miguel Ferraz e Pedro Silva por todo o encorajamento e preocupação.

Agradeço ao meu namorado, Daniel Guimarães pelo carinho e paciência demonstrados e pelo incentivo incondicional.

Por fim, agradeço em especial às pessoas que mais amo, os meus pais, por serem simplesmente incondicionais sempre e á minha avó por nunca deixar de acreditar em mim.

## Sumário

Os estuários são ambientes de elevado valor ecológico, no entanto são frequentemente sujeitos a pressões antropogénicas que condicionam a sua qualidade. O Estuário do Sado é um exemplo de uma área sujeita a diversas pressões humanas, revestindo-se de particular importância económica para as populações locais. Neste sentido, o objectivo deste trabalho foi avaliar o impacto da contaminação estuarina na saúde da espécie *Ruditapes decussatus* (L. 1758), ou amêijoia-boia, de modo a contribuir para uma abordagem de avaliação de risco ecológico. Para o efeito, foram recolhidas amostras de amêijoia-boia dos principais pontos de pesca dos pescadores da Carrasqueira no Estuário do Sado e do Estuário do Mira (sistema de referência). Para a avaliação da qualidade biológica foram seleccionados os dados morfométricos dos indivíduos de ambas as estações e avaliado o desempenho de dois biomarcadores: teor de metalotioneína (exposição) e biomarcadores histopatológicos (efeito), na glândula digestiva. Para a caracterização da qualidade sedimentar recolheram-se dados históricos de contaminação por metais e metalóides, complementados com a determinação da fracção fina e matéria orgânica. A interpretação do potencial de risco baseou-se no contraste dos níveis de contaminação para os estuários com os níveis TEL (*threshold effects level*) e PEL (*probable effects level*) para cada elemento analisado e também através da estimativa dos índices de risco ecológico (SQG-Q). Relativamente aos níveis de metalotioneína (MT) os indivíduos do estuário do Mira registaram valores superiores aos indivíduos do Sado. Em contrapartida, foi possível observar uma maior incidência de histopatologias nos indivíduos do Sado, resultado que se revelou coerente com a contaminação sedimentar, uma vez que o sedimento do Sado registou os teores mais elevados de metais, sendo que o zinco, o cobre e o cádmio, atingiram concentrações superiores ao respectivo PEL, o que está de acordo com os valores do índice SQG-Q máximo para o Sado (1,08) e Mira (0,24). Assim, sustenta-se que o estuário do Sado é efectivamente mais contaminado por metais, o que se pode traduzir em efeitos adversos para os organismos, tal como detectado pela análise histopatológica, embora não confirmado pela determinação da concentração de MT, provavelmente modulada por variáveis endógenas e exógenas não determinadas. Desta forma é também possível concluir-se que, mediante ambientes geo-quimicamente complexos como os existentes em estuários, em particular no estuário do Sado, os biomarcadores de efeito, poderão ter mais potencial enquanto biomarcadores de carácter não-específico.

## Abstract

Estuaries are environments of high ecological value, but often subject to anthropogenic pressures that affect their quality. The Sado Estuary is an example of an area subject to various human pressures, with particular economic importance for local populations. In this way, the purpose of this study was to evaluate the impact of contamination on the health of estuarine species *Ruditapes decussatus* (L. 1758), or clam, to contribute to an approach of risk assessment to the species. To that end, samples of clams were collected in the main fishing points of Sado and Mira Estuary (reference system). To evaluate the biological quality, morphometric data of individuals were selected from both stations and the performance of two biomarkers was evaluated: levels of metallothionein (exposure) and histological biomarkers (effect) in the digestive gland. To characterize the sediment quality, historical data of contamination by metals and metalloids was used, complemented by the determination of the fine fraction and organic matter. The interpretation of the potential risk was based on the contrast between levels of estuarine contamination and TEL (threshold effects level) and PEL (probable effects level) levels for each element and also through a estimative of the ecological risk index (SQG-Q). The individuals of Mira estuary recorded higher levels of metallothioneins (MT) than individuals from Sado. Nevertheless, we observed a higher incidence of histological lesions in the individuals of Sado, a result which proved to be consistent with the analysis of sediment, since the sediment of Sado recorded higher levels of metals, with zinc, copper and cadmium, reaching concentrations above its PEL, which is consistent with the maximum values of the SQG-Q index for Sado (1.08) and Mira (0.24). Thus, it is argued that Sado estuary is actually more contaminated with metals, which can cause adverse effects on organisms, as detected by histopathology, although not confirmed by the determination of induction of MT, probably modulated by undetermined endogenous and exogenous variables. It is also possible to conclude that in geochemical complex environments, such as those existing in estuaries, particularly in the Sado Estuary, biomarkers of effect may have more potential as biomarkers of non-specific order.

## **Simbologia**

Cd – cádmio

Cu - cobre

C - comprimento

DPP-SMDE - differential pulse polarography at a static mercury drop electrode (Eléctrodo de mercúrio de gota estática)

FF – fracção fina

GSH – Glutadiona

H & E – Hematoxilina e Eosina

ICP-MS - Inductive Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

LOE – Lines of Evidence (Linhas de Evidência)

MOT – Matéria Orgânica Total

MT – Metalotionina

PAH's – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

PEL – Probable Effect Level

PEL –Q – PEL quocient

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes

Ps – Peso seco

Pt – Peso total

SQG – Sediment Quality Guidelines (Valores-guia para a Qualidade Sedimentar)

SQG-Q – Sediment Quality Guidelines Quocient

SQT – Sediment Quality Triad (Tríade da Qualidade Sedimentar)

TEL – Threshold Effect Level

Zn – zinco

## Índice de Matérias

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Amostragem .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Análise biológica.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1. Dados morfométricos .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2. Metalotioninas.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.3. Histopatologia.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Análise sedimentar .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Análise estatística.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5. Metodologia .....</b>	<b>20</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Análise biológica.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1. Dados morfométricos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2. Metalotioninas.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3. Histopatologia.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Análise sedimentar .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Análise Estatística .....</b>	<b>32</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSÕES E DESENVOLVIMENTOS FUTUROS.....</b>	<b>41</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da Tríade de Qualidade Sedimentar .....	3
<b>Figura 2</b> – Mapa do Estuário do Sado com o local de amostragem (zona a vermelho) .....	15
<b>Figura 3</b> – Mapa do Estuário do Mira com o local de amostragem (zona a vermelho) .....	15
<b>Figura 4</b> – Pontos de amostragem de sedimento do Estuário do Sado .....	19
<b>Figura 5</b> – Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo .....	21
<b>Figura 6</b> – Concentração média de MT (mg/g ps) e desvio padrão na estação do Sado (S) e na estação do Mira (M).....	24
<b>Figura 7</b> – Secção histológica da glândula digestiva da espécie <i>R.decussatus</i> do Estuário do Mira (H&E) .....	25
<b>Figura 8</b> – Secção histológica da glândula digestiva da espécie <i>R.decussatus</i> do Estuário do Sado (H&E) .....	26
<b>Figura 9</b> – Concentração mínima e máxima de metais com respectivos valores de PEL e TEL para o Estuário do Sado e Mira.....	30

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Principais funções das metalotioninas .....	8
<b>Tabela 2</b> - Média e desvio padrão do comprimento e peso total dos indivíduos do Estuário do Sado e Mira.....	23
<b>Tabela 3</b> – Média e desvio padrão da concentração de MT na estação do Sado e do Mira ...	24
<b>Tabela 4</b> – Marcadores histopatológicos para a análise estrutural da glândula digestiva da <i>R.decussatus</i> .....	27
<b>Tabela 5</b> – Caracterização física dos sedimentos .....	28
<b>Tabela 6</b> – Concentração mínima e máxima de metais ( $\mu\text{g/g}$ Ps sedimento) para cada Estação .....	28
<b>Tabela 7</b> – Valores de PEL e TEL para cada metal analisado no presente estudo .....	29
<b>Tabela 8</b> - Valores máximos e mínimos do Índice SQG-Q para o Estuário do Mira e do Sado	31
<b>Tabela 9</b> – Valores de p para cada teste estatístico e cada variável de ambas as estações....	32
<b>Tabela 10</b> – Correlações de Spearman entre variáveis ( $p < 0,05$ ) .....	33

## **Anexos**

<b>Anexo 1-</b> Comprimento e peso total dos indivíduos do estuário do Sado (n=21) e estuário do Mira (n=14).....	62
<b>Anexo 2-</b> Concentração de metalotioninas ( $\mu\text{g/g}$ Ps) registada para os indivíduos do estuário do Sado (n=21) e do Mira (n=14) .....	63

## **1. Introdução**

### **1.1. Importância da Avaliação de Risco Toxicológico**

O crescimento económico e a exploração ineficiente de recursos naturais geram impactos nos ecossistemas e na saúde humana, tornando-se essencial a mitigação dos riscos associados à degradação ambiental. Neste contexto, a Avaliação de Risco Ambiental fornece informações necessárias sobre os riscos, as suas consequências sociais, económicas e ambientais, constituindo uma ferramenta essencial, para a tomada de decisões bem fundamentadas e a busca de um equilíbrio sócio-ecológico.

De acordo com a EPA (2008) a avaliação de risco ecológico consiste na determinação da natureza e da probabilidade de ocorrerem efeitos das acções humanas em animais, nas plantas e no ambiente.

É o processo no qual são tomadas decisões sobre a tolerabilidade do risco através da comparação entre o risco estimado e o risco definido como tolerável, de modo a determinar a sua significância (Pires, 2005). Tem como principal objectivo, diagnosticar, avaliar e gerir o risco imposto ao meio ambiente e ao homem, visando a prevenção da ocorrência de consequências adversas, sendo portanto uma ferramenta muito útil para a gestão do risco.

### **1.2. Importância dos Estuários e Ambiente Sedimentar**

Os estuários são zonas de elevada produtividade e biodiversidade, cruciais para a manutenção da vida de inúmeras espécies de peixes, invertebrados e aves, muitas delas, de elevado interesse comercial. Uma vez que estão frequentemente sujeitos a intensas pressões antropogénicas, os estuários encontram-se muitas vezes contaminados, podendo constituir uma ameaça para as comunidades residentes. A maioria dos contaminantes que atingem as zonas costeiras tendem a ser adsorvidos á matéria particulada e a fixar-se no sedimento. Tendo em conta o seu potencial para concentrar contaminantes metálicos, o ambiente sedimentar pode constituir uma fonte para a bioacumulação de contaminantes como os metais em invertebrados bentónicos, suspensívoros ou

detritívoros, potenciando eventuais efeitos adversos a níveis complexos de organização biológica (Lee *et al.*, 2000).

Neste contexto, a contaminação sedimentar constitui um risco acrescido para inúmeras espécies de interesse comercial, que vivem associadas ao sedimento e portanto são particularmente vulneráveis a compostos tóxicos (Wright & Mason, 1999).

Poucos estudos desenvolvidos em estuários têm explorado a relação entre a qualidade do sedimento e o grau de actividades humanas em zonas costeiras. No entanto, Comeleo *et al.* (1996) e Dauer *et al.* (2000) encontraram correlações positivas entre as pressões humanas (densidade populacional, uso do solo ou descargas pontuais/ não pontuais) e a contaminação sedimentar ou da comunidade bentónica. Deste modo, deve ser efectuada uma caracterização completa dos constituintes sedimentares para avaliar os níveis de contaminação presentes e a distribuição dos contaminantes, a fim de melhor identificar as fontes, tendências e os fluxos de poluentes (Queralt *et al.*, 1999).

É fundamental, estabelecer metodologias para uma avaliação de risco ecológico de sedimentos contaminados, a fim de analisar os efeitos das pressões antropogénicas sobre os ambientes estuarinos. Os sedimentos são meios complexos no que diz respeito às suas características físicas, químicas e biológicas, deste modo é necessária uma abordagem holística e integrada na caracterização do risco ecológico sedimentar, tendo em conta a sua composição química e biótica, a sua diversidade, bem como os efeitos de contaminantes associados ao sedimento para os organismos aquáticos (Chapman & Hollert, 2006).

Estes mesmos autores, defenderam uma metodologia designada “Evidência Ponderada” para avaliar a qualidade ambiental dos sedimentos no contexto da Avaliação de Riscos Ambientais. Esta integra as determinações toxicológicas relacionadas com a contaminação química e física e as possíveis mudanças ecológicas.

A “Triade de Qualidade Sedimentar” (SQT- *Sediment Quality Triad*) constitui uma abordagem de “Evidência Ponderada” (Chapman *et al.* 2002) na determinação de eventuais impactos ecológicos

associados aos sedimentos, sendo baseada na ponderação de múltiplas linhas de evidência (LOE – *Lines of Evidence*).

Esta abordagem constitui uma ferramenta consistente para a avaliação do efeito da contaminação de sedimentos e pode ser utilizada como suporte à decisão (Chapman & Anderson 2005), sendo constituída por três componentes: 1. Química sedimentar para determinar a contaminação química; 2. Bioensaios de sedimentos para avaliar a toxicidade; 3. Estrutura da comunidade bentónica para determinar o estado da fauna residente indiscutivelmente mais exposta aos contaminantes do sedimento



**Figura 1** – Representação esquemática da Tríade de Qualidade Sedimentar (Adaptado de DelValls *et al.*, 1998)

O documento “Valores-guia para a qualidade do sedimento”(SQG - *Sediment Quality Guidelines*, em inglês) é uma importante ferramenta, fornecendo orientações para o estudo da contaminação dos sedimentos e para o cálculo de índices de risco ecológico. Estas orientações avaliam o potencial nocivo de sedimentos contaminados para os organismos aquáticos e são concebidas para auxiliar a interpretação da qualidade do ambiente sedimentar (Wenning & Ingersoll, 2002).

Grande parte das orientações SQG desenvolvidas têm sido aplicadas a águas marinhas (Long *et al.*, 1995), no entanto, o mesmo não sucede para as águas estuarinas (Chapman & Wang, 2001), sendo o

trabalho de Wilson & Jeffrey (1987) um raro exemplo de orientação SQG desenvolvida especificamente para estuários.

Para verificar o risco ecológico associado ao ambiente sedimentar é frequente a utilização do índice SQG-Q (*Sediment quality guideline quotient*). Este índice funciona como um indicador da tendência para observar efeitos biológicos adversos no biota devido á mistura de contaminantes com diferentes concentrações e revela-se um dado numérico bastante útil para uma primeira análise da contaminação química do sedimento. (Long & MacDonald, 1998; Chapman & Wang, 2001).

De acordo com MacDonald *et al.* (1996) para o cálculo do índice de risco ecológico SQG-Q, são utilizados os seguintes valores-guia: TEL (*Threshold Effect Level*), que representa a concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos adversos para os organismos aquáticos e o PEL (*Probable Effect Level*), que define a concentração acima da qual frequentemente são esperados efeitos adversos para os organismos.

### **1.3. Importância dos Bivalves como Bioacumuladores de Metais**

Os moluscos bivalves vivem associados ao sedimento de muitos estuários e são frequentemente utilizados como bioindicadores de poluição por metais, uma vez que conseguem acumular estes elementos nos seus tecidos, indicando o grau de contaminação ambiental do sistema em que se encontram.

Estes moluscos são sésseis, de fácil recolha, na sua maioria são filtradores e possuem uma vasta distribuição, estando presentes ao longo de todo o ano e respondendo rapidamente às variações das concentrações de metais biodisponíveis no meio (Rezende & Lacerda, 1986; Blackmore *et al.*, 1998).

Estes organismos acumulam a maior parte dos contaminantes a níveis muito mais elevados do que os encontrados na coluna de água, sendo representativos da poluição de uma área e permitindo a monitorização da qualidade das águas costeiras (Rainbow, 1995)

Em comparação com os peixes e crustáceos, os bivalves têm baixos níveis de actividade dos sistemas enzimáticos capazes de metabolizar poluentes orgânicos persistentes (POPs), como os hidrocarbonetos aromáticos e policlorados e portanto a concentração de contaminantes nos seus tecidos, reflecte com maior precisão a magnitude da contaminação ambiental (Phillips, 1977, 1980, 1990).

#### **1.4. Importância e Caracterização da Espécie *Ruditapes decussatus*.**

O bivalve em estudo é a amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) e tem sido considerado um promissor bioindicador de contaminação ambiental (Moralez *et al.*, 2004).

Segundo Vilela (1950), a espécie *R. decussatus*, povoa zonas abrigadas do litoral, como enseadas, estuários, embocaduras de rios, lagoas costeiras e outros ambientes protegidos vivendo associada ao sedimento, normalmente em zonas de areias médias e finas, mais ou menos vasosas, a uma profundidade máxima de 10 a 12 cm, dependendo do seu tamanho.

A sua distribuição em profundidade, depende de factores como a consistência do sedimento, o estado fisiológico dos indivíduos e o tamanho dos sifões, enquanto a sua distribuição à superfície é influenciada pelas linhas limites das marés (Vilela, 1950; Guelorget *et al.*, 1980; Furtado, 1991). De acordo com Parache, 1982 a distribuição geográfica da amêijoia-boia estende-se ao longo da costa Atlântica, desde as ilhas britânicas á Mauritânia no Mar Mediterrâneo e no Mar Vermelho.

Em Portugal, a espécie *R. decussatus* situa-se maioritariamente na Ria Formosa, embora ocorra em outros locais, como a Ria de Aveiro, Lagoa de Óbidos, margem esquerda do Tejo, Tróia e imediações da Foz do Sado, Rio Arado, Ria de Alvor (Vilela, 1950).

Uma vez que se trata de uma espécie filtradora, a amêijoia-boia é capaz de ingerir partículas em suspensão na água (regime alimentar suspensívoro) (Parache, 1982). O processo de alimentação é desencadeado com o bombeamento de água através dos sifões, na interface água-sedimento, que é conduzida para as brânquias onde é filtrada. A dieta é variada, sendo constituída essencialmente por

microrganismos, detritos orgânicos, microalgas planctónicas e bentónicas como as diatomáceas e as cianobactérias. (Plante-Cuny, 1981).

### **1.5. Biomarcadores**

Para a medição dos efeitos biológicos na avaliação da qualidade ambiental é possível recorrer ao uso de biomarcadores. Estes correspondem a alterações numa determinada resposta biológica (molecular, celular, resposta fisiológica ou comportamental), que pode estar relacionada com a exposição a contaminantes no meio ambiente. (Peakall, 1994).

Uma das características mais importantes dos biomarcadores é o seu potencial para antecipar mudanças, mesmo nos níveis mais elevados da organização biológica (ou seja, população, comunidade ou ecossistema). Este poder preditivo que lhes está associado, permite a sua aplicação no desenvolvimento de estratégias de biorremediação, de forma a evitar danos ambientais irreversíveis.

De acordo com o NRC (1987), e WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em 3 classes:

- *Biomarcadores de exposição*: (ou biomarcadores de dose interna) Podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, a uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna.

- *Biomarcadores de efeito*: Usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos para a saúde, decorrentes da exposição e absorção da substância química. Desta forma, a ligação dos biomarcadores de exposição e efeito contribui para a definição da relação dose-resposta.

- *Biomarcadores de susceptibilidade*: Permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos. Podem reflectir factores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química. Estes são factores pré-existentes e independentes da exposição. São predominantemente genéticos, embora outros agentes ambientais possam também alterar a susceptibilidade individual.

Estes biomarcadores indicam quais os factores que podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais.

No presente estudo foram apenas utilizados biomarcadores de exposição e de efeito: As metalotioninas e a histopatologia respectivamente.

As **metalotioneínas** (MTs) são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular (6 – 7 kDa), com uma estrutura molecular composta por uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam cerca de 30% do total de aminoácidos (57-75 aminoácidos). A abundância de ligantes tiol dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere á proteína uma alta afinidade para iões metálicos livres, tornando estas proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico (Nordberg, 1998).

De acordo com Kojima (1991) as MT's foram descobertas em 1957 quando Margoshes e Vallee identificaram no córtex renal do cavalo, uma proteína rica em enxofre responsável pela acumulação natural de cádmio (Cd) neste tecido (Margoshes & Vallee 1957). Desde então, as MTs são os únicos compostos biológicos conhecidos por conter naturalmente cádmio.

Com o desenvolvimento de estudos posteriores, pôde confirmar-se a indução de MT por outros metais como o zinco (Zn) e o cobre (Cu). Desde a sua descoberta, têm sido desenvolvidos esforços, no sentido de caracterizar a componente química e estrutural da molécula.

A estrutura da MT possui duas disposições: *tetraédrica* – na qual um cluster está ligado a quatro átomos de metal; *triangular* – na qual 1 cluster está ligado a três átomos de metal. A ocorrência da sequência de tripeptídeos na forma **Cys-X-Cys** é comum a todas as MT's, onde X representa um aminoácido diferente de cisteína. Estudos posteriores sobre o seu espectro de absorção demonstraram por ausência de absorção a 280nm, que a sua estrutura era livre de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (Nordberg, 1998).

Em espécies aquáticas, as metalotioneínas foram primeiramente descritas em 1974 no citoplasma e núcleo de peixes marinhos *Sebastes seboides* (Olafson & Thompson, 1974), e posteriormente em outras espécies como a enguia Europeia *Anguilla anguilla* (Bouquegneau *et al.*, 1975), a carpa, *Cyprinus carpio* (Kito *et al.*, 1982) e a truta, *Oncorhynchus mykiss* (Ley *et al.* 1983 & Linde *et al.* 1999). As funções biológicas das MT's estão estreitamente relacionadas com a sua estrutura química e forte afinidade para metais. Têm sido efectuados numerosos trabalhos para determinar a sua principal função, no entanto estas proteínas parecem exercer várias funções em simultâneo.

Na tabela 1, estão presentes as principais funções das metalotioninas.

**Tabela 1-** Principais funções das metalotioninas

<b>Proteína</b>	<b>Funções</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
	- Acção de metaloproteínas no transporte de iões metálicos para outras proteínas	Nolan & Duke, 1983
	- Transferência e armazenamento de metais não-essenciais (Zn e Cu) e controlo da sua concentração, fornecendo protecção contra a toxicidade de metais	Viarengo <i>et al.</i> , 1985
<b>Metalotionina</b>	- Detoxificação de radicais livres como Cd e Hg	Sato <i>et al.</i> , 1993
	- Protecção contra a toxicidade de químicos e medicamentos, protecção contra a destruição de DNA	Sato <i>et al.</i> , 1993; Lazo, 1995; Oikawa, <i>et al.</i> 1995
	- Intervenção no metabolismo homeostático de oligoelementos através do abastecimento de diferentes compartimentos celulares com Cu e Zn	Viarengo, 1985; Dallinger, 1996
	- Protecção das células contra o stress oxidativo resultante da exposição excessiva a metais	Muto <i>et al.</i> , 1999

Esta componente multifuncional dificulta a compreensão da actuação das metalotioninas, podendo as formas de resposta variar extensivamente em relação ao grupo animal (Dallinger, 1996).

A gama de metais capazes de se ligarem a MT é ampla, sendo que a maior parte dos iões metálicos das famílias I-B e II-B da tabela periódica são conhecidos por se ligarem aos grupos cisteína-SH e a afinidade dos iões metálicos para os locais de ligação segue a ordem encontrada para tiolatos inorgânicos, isto é, Hg (II), (Ag) (I), Cu (I), Cd (II) e Zn (II) (Viarengo *et al.* 2000).

As concentrações de MT dependem de inúmeros factores bióticos (ciclo anual, sexo, relação idade/tamanho e peso) e abióticos, como tal é necessário efectuar uma análise de todos os intervenientes na expressão da proteína, para que esta seja utilizada como biomarcador eficaz de exposição a metais.

A indução de MT relaciona-se geralmente com a exposição a metais e metaloides, no entanto, existem outros elementos com a capacidade para regular os seus teores. Por exemplo, num estudo desenvolvido com a *Corbicula fluminea*, verificou-se que a transcrição de MT estava positivamente relacionada com o aumento da actividade metabólica, resultante do aumento sazonal de temperatura (Bigot *et al.* 2009). Também num estudo efectuado com a *Cerastoderma edule*, sugere-se que até mesmo os parasitas podem influenciar a síntese de MT e conseqüentemente interferir na resposta destas proteínas á contaminação por metais (Baudrimont *et al.* 2006).

Por outro lado, a correlação positiva entre os factores de bioacumulação de cádmio e a síntese de MT sugere que a indução desta proteína depende da biodisponibilidade de fortes indutores como o cádmio, existindo, portanto uma variabilidade de respostas possíveis, como foi sugerido por outros estudos (Costa *et al.*, 2008).

De acordo com Risso-De Faverney *et al.* (2000) baixos teores de MT podem ser parcialmente explicados por efeitos resultantes das interacções entre contaminantes. Os PAH's por exemplo, revelaram-se fortes supressores da biossíntese de MT mesmo na presença de metais fortemente indutores.

Num estudo desenvolvido com mamíferos, insectos e crustáceos, a presença de hormonas glucocorticoides induziu a síntese de MT, enquanto factores como a temperatura e o estado nutricional afectaram a ligação de metais à esta proteína. Foi ainda sugerido que a síntese de MT pode ser reduzida na presença de elevados níveis de contaminantes orgânicos devido ao aumento da procura de resíduos de cisteína para a síntese de GSH. (Stegeman *et al.*, 1992; Muto *et al.*, 1999).

Deste modo e para compreender melhor os efeitos de metais na resposta das MTs em organismos aquáticos, é importante considerar que estes organismos são expostos a misturas de polimetálicos e compostos orgânicos no seu ambiente natural, ao mesmo tempo ou em tempos relativamente próximos (Kraak *et al.*, 1993).

No que respeita às técnicas de análise de MTs, a cromatografia líquida de alta resolução e as técnicas de biologia molecular, introduziram progressos na detecção e purificação das metalotioninas. Estas proteínas não têm função catalisadora conhecida, sendo a sua quantificação efectuada por espectrofotometria de absorção atómica, por meio de rotulagem com radionuclídeos, ou pela quantificação da proteína em si (Hammer, 1986). Neste último caso, os métodos de separação mais conhecidos são as cromatografias de exclusão molecular e intercâmbio iónico, electroforeses em gel de poliacrilamida e cromatografia líquida de alta pressão.

Através da combinação de determinações de MT com as observações de perturbações associadas ao teor de metais nos tecidos animais, será possível uma visão mais sensível sobre o processo de bioacumulação, transferência, armazenamento e eliminação de metais. (Langston *et al.* 1998; Isani *et al.* 2000; Cosson 2000).

A **histopatologia** destaca-se como o biomarcador de efeito utilizado neste estudo e constitui uma poderosa ferramenta para a monitorização da contaminação antropogénica (Stentiford *et al.* 2003; El-Shenawy *et al.* 2007).

O estudo das respostas dos tecidos como lesões ou doenças, pode identificar condições de alerta precoce em organismos marinhos antes da ocorrência de anormalidades avançadas. Segundo Ferreira (2004), a histopatologia traduz a lesão integrada em função da duração e da

intensidade de exposição ao elemento tóxico, bem como a capacidade adaptativa de um determinado tecido e de acordo com Hinton *et al.*, 1992 constitui o método mais rápido de detecção de efeitos adversos de exposição (agudos e crónicos).

A maioria dos estudos histopatológicos tem-se focado na análise do fígado de organismos superiores, como os peixes e embora já tenham ocorrido tentativas para desenvolver biomarcadores histopatológicos fiáveis em moluscos bivalves, são necessárias mais pesquisas para suportar as associações entre lesões e exposição a contaminantes.

Grande parte das lesões histopatológicas pode estar relacionada com factores de stress ambiental, como a presença de metais pesados nos tecidos moles (Gold-Bouchot *et al.* 1995). As Brânquias e a glândula digestiva dos moluscos bivalves revelam boas características para a elaboração de estudos de poluição interferindo em processos metabólicos essenciais, na respiração e na recolha, absorção e digestão de alimentos e reservas (Gold-Bouchot *et al.* 1995; Syasina *et al.* 1997; Zaldibar *et al.* 2007, 2008).

Uma vez que estão em contacto directo com os compostos metálicos presentes no meio circundante, as brânquias constituem a principal interface para a incorporação de elementos dissolvidos na água (Viarengo, 1989). Ao serem incorporados, os metais são ligados à metalotionina, inseridos nos lisossomas, e liberados para a hemolinfa e os hemócitos circundantes (Marigomez *et al.*, 2002). Estas características fazem deste tecido, um alvo para se avaliar a bioconcentração relacionada com a exposição recente (aguda) (Choi *et al.*, 2007).

Em contrapartida, a glândula digestiva reflecte um maior tempo de exposição (crónica) (Hamza-Chaffai *et al.*, 2000), sendo responsável pela acumulação e desintoxicação de diversas substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas. Estudos histológicos, citológicos e histoquímicos têm demonstrado que as células epiteliais dos túbulos da glândula digestiva são um alvo sensível no que remete para o impacto negativo de muitos poluentes marinhos.

Os efeitos dos metais e outros poluentes, na estrutura celular da glândula digestiva dos bivalves e a eventual utilização de tais alterações celulares como biomarcadores de exposição a xenobióticos, têm sido investigados por vários autores, por exemplo, Lowe (1988), Lowe & Clarke (1989), Vega *et al.* (1989), Marigomez *et al.* (1990), Etxeberria *et al.* (1994), Cajaraville *et al.* (1995), Etxeberria *et al.* (1995), Jonnalagadda & Rao (1996) Marigomez *et al.* (1998) e Regoli (1998). Através da observação microscópica, alguns dos autores referidos quantificaram as mudanças na estrutura de células da glândula digestiva e utilizaram diferentes biomarcadores histopatológicos, (regressão tubular, lesões necróticas degenerativas, hiperplasia e hipertrofia das células digestivas) para ilustrar os efeitos negativos de contaminantes na glândula digestiva dos moluscos bivalves (Lowe & Clarke, 1989; Vega *et al.* 1989; Marigomez *et al.* 1990; Etxeberria *et al.* 1994; Etxeberria *et al.* 1995; Cajaraville *et al.* 1995; Marigomez *et al.* 1998; Usheva *et al.* 2006).

As técnicas quantitativas têm sido cada vez mais utilizadas para suportar os resultados qualitativos, uma vez que, de acordo com Lowe & Clarke (1989), parte da subjectividade associada á histologia descritiva pode ser evitada através da quantificação. As técnicas quantitativas podem também fornecer indícios precoces de toxicidade, possuindo maior sensibilidade e precisão comparativamente à utilização exclusiva de técnicas qualitativas (Howard *et al.* 2004).

## **1.6. Caracterização da Zona em Estudo**

O estuário do Sado é o segundo maior estuário de Portugal, possuindo uma área de aproximadamente 24000 ha e localiza-se no distrito de Setúbal. Grande parte do estuário é classificada como reserva natural (DL nº 430/80) exceptuando a cidade de Setúbal, o seu porto e a sua periferia. A nível internacional o estuário encontra-se protegido pela Convenção de Ramsar, devido ao seu elevado valor ecológico e grande diversidade de espécies animais e vegetais (Caeiro *et al.*, 2002).

O Estuário do Sado encontra-se fortemente sujeito a pressões humanas, salientando-se a existência de aterros para resíduos perigosos na margem norte (Catarino *et al.* 1987; Ferreira, 1998) e de várias

unidades industriais de produção de papel e celulose, pesticidas, fertilizantes, fermentos, e alimentos, situadas na península de Setúbal. As actividades portuárias e a cidade de Setúbal, juntamente com as minas na bacia do Sado, utilizam o estuário para a eliminação de resíduos sem tratamento adequado. (Caeiro *et al.* 2002).

No estuário são ainda conduzidas intensas actividades de exploração de recursos piscícolas (cerca de 1000 ha) (Painho *et al.*, 1996) e nas zonas a montante as práticas agrícolas, em particular a colheita de tomate e de arroz, constituem o principal uso do solo (cerca de 10.000 ha) com uma produção de cerca de 5000 – 6500 kg/ha.

Algumas destas actividades incluem a descarga de contaminantes como metais, fertilizantes, hidrocarbonetos e pesticidas no estuário, gerando efeitos negativos na qualidade da água, do sedimento e das comunidades bióticas. (IH, 1993; Caeiro, 1996; Ferreira, 1998 & Cerejeira *et al.*, 1999).

A Carrasqueira é uma povoação situada no extremo sul do estuário do Sado, entre a localidade da Comporta e a cidade de Alcácer do Sal. Uma das suas particularidades é o modo de vida dos seus habitantes, que são ao mesmo tempo, pescadores e agricultores. É portanto evidente, a importância do estuário tanto para a população local que dele se subsistem, como para o desenvolvimento da economia local. Entre as espécies capturadas no estuário destacam-se alguns peixes, *Gobius niger* (Antunes & Lopes Da Cunha, 2002), *Solea senegalensis* (Costa *et al.* 2008) *Solea solea* (Cabral, 2000) *Monochirus hispidus* (Cunha 1994 & Cabral 2000); moluscos cefalópodes, *Sépia officinalis* (Rosado *et al.* 1993) *Octopus vulgaris* (Raimundo *et al.*, 2010); bivalves, *Cerastoderma edule* (Picado & Le Gal, 1990), *Crassostrea angulata* (Ferreira & Vale, 2001) *Ruditapes decussatus* e *Venerupis spp* (Castro 1990 em Rosado *et al.* 1993) e poliquetas, *Marphysa sanguinea* (Garcês & Costa, 2009).

O Estuário do Mira, foi utilizado como sistema de referência e situa-se na costa sul portuguesa (37 ° 45' N; 8° 45' W). A cobertura terrestre na bacia hidrográfica do Mira é essencialmente rural, reflectindo valores baixos de densidade populacional na região do Alentejo. A actividade industrial não exerce grande influência nesta zona, pelo que a maior parte da carga de nutrientes depositada

no estuário provem de fontes difusas, resultantes de actividades agrícolas e pequenas áreas urbanas, como Vila Nova de Mil Fontes (Ferreira *et al.*, 2003).

De acordo com Andrade (1986) o gradiente estuarino de jusante para montante é caracterizado por:

a. Diluição da salinidade; b. Aumento da turbidez; c. Diminuição do diferencial térmico em relação á atmosfera; d. Diminuição da percentagem de saturação.

Verticalmente, na direcção da superfície para o fundo, o gradiente estuarino é caracterizado por:

a. Aumento da salinidade; b. Aumento da turbidez; c. Aumento do diferencial térmico em relação á atmosfera; d. Diminuição da percentagem de saturação.

As flutuações físico-químicas do estuário devem-se a vários factores, destacando-se: - a morfologia do estuário, com ausência de desníveis na secção terminal do rio, que facilita a penetração das marés a montante; - a densidade pluviométrica no período de Janeiro a Março associada a uma precipitação média anual reduzida devido aos períodos de seca anuais; - A retenção da precipitação média anual (cerca de 30 %) na barragem de Santa Clara-a-Velha (Andrade, 1986).

Vários estudos biológicos têm sido desenvolvidos no Estuário do Mira, por exemplo Costa *et al.* (1987), Almeida (1988), Ferreira (1994) e Silva de Almeida (2000), no entanto não existe informação relativamente á contaminação associada a este Estuário.

## **Objectivos**

Com o presente estudo, pretende-se avaliar o impacte da contaminação estuarina na saúde da espécie *R. decussatus*, comparando as diferenças entre os indivíduos do Estuário do Sado e os indivíduos do Estuário do Mira. A utilização de biomarcadores de exposição e de efeito em complemento com a análise sedimentar, servirão de ferramenta para avaliar o potencial risco ecológico associado á espécie.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem

Em Outubro de 2010 foi efectuada a amostragem de sedimento em dois pontos no estuário do Sado na área assinalada no mapa (N: 38° 48' 78'' W: 08° 84' 64'') (Figura 2), a qual corresponde à zona preferencial de pesca dos pescadores da Carrasqueira durante este período do ano.

Em Dezembro de 2010 foi efectuada a amostragem em um ponto no estuário do Mira, no viveiro de Foros de Galeado (N: 37° 43' 84'' W: 08° 45' 22'') (Figura 3).



Figura 2 – Mapa do Estuário do Sado com o local de amostragem (zona a vermelho)



Figura 3 – Mapa do Estuário do Mira com o local de amostragem (zona a vermelho)

Em cada local de amostragem foram recolhidas três réplicas que foram homogeneizadas, divididas em duas partes e transportadas no frio para o laboratório. Aqui, uma parte foi imediatamente congelada para análises posteriores dos contaminantes presentes e outra parte foi processada para

análise de fracção fina e de matéria orgânica.

No que respeita à amostragem de amêijoas, foram recolhidos 21 indivíduos (comprimento de  $39,0 \pm 3,5$  mm e peso de  $12,71 \pm 3,73$  g) do estuário do Sado e 21 indivíduos do estuário do Mira (comprimento de  $46,4 \pm 5,3$  mm e peso de  $20,4 \pm 7,4$  g).

## **2.2. Análise biológica**

### **2.2.1. Dados morfométricos**

Foi registado o comprimento da concha e o peso total de todos os indivíduos e posteriormente procedeu-se à dissecação dos organismos, para recolha da glândula digestiva. O material para posterior análise química e bioquímica foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e os tecidos para avaliação de histopatologias foram de imediato processados.

### **2.2.2. Metalotioninas**

Os níveis de MT foram determinados através da quantificação dos grupos tiol presentes nas amostras de glândula digestiva dos 21 indivíduos amostrados em cada estação (Costa *et al.* 2008). As amostras de tecido fresco foram homogeneizadas em 3 ml de solução Tris-HCL 0,02 M (pH 8,6) e centrifugadas a 17000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1h, com vácuo.

Para a destruição das proteínas termicamente menos estáveis, o sobrenadante foi aquecido num banho-maria a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 10 min e posteriormente centrifugado de acordo com a descrição anterior.

A leitura das concentrações de MT (anexo 2) foi obtida por Polarografia Diferencial por Impulsos, com a utilização de um eléctrodo de mercúrio de gota estática (DPP-SMDE), através do processador 693 VA combinado com a plataforma 694 VA (Metrohm, Herisau, Switzerland).

Devido à inexistência de padrão de MT para bivalves, utilizou-se para o mesmo fim, as isoformas I &

II de MT de Coelho. (Sigma, St Louis, MO, USA).

As amostras que não foram lidas de imediato, foram mantidas a uma temperatura de -80°C.

### **2.2.3. Histopatologia**

Para a análise histopatológica da *R. decussatus* foram recolhidas amostras da glândula digestiva de três indivíduos de cada estação (Sado e Mira), que foram fixadas numa solução de Bouin (10% de formaldeído (v/v), 7% de ácido acético (v/v) e ácido pícrico até à saturação) durante aproximadamente 48 horas à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram lavadas com água da torneira e deixadas em imersão durante um período de 24 horas, para retirar o excesso de ácido pícrico.

Para o processo de desidratação, as peças foram submetidas a sucessivos banhos de etanol de graduação crescente (a 70%, 96% e 100%) e posteriormente a três banhos sucessivos de xilol (100%), como impregnante intermédio. De seguida, as amostras foram impregnadas em parafina durante um período de 12 horas. Os blocos de parafina foram cortados em secções de 5 µm num micrótomo Jung RM 2035 da Leica Microsystems. Os cortes foram colocados em lâminas para serem corados com hematoxilina e eosina (H & E) (Martoja & Martoja, 1967), montados em DPX (reagente de montagem) e observados num microscópio DMLB da Leica Microsystems, ao qual está acoplada uma câmara DFC480

### 2.3. Análise sedimentar

Os sedimentos foram analisados para a fracção fina (FF), Matéria Orgânica Total (MOT) e contaminação metálica.

A **fracção fina** foi obtida através da remoção da matéria orgânica com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguida de desagregação com pirofosfato, lavagem e crivagem hidráulica através de uma malha de 63 µm. Os resultados são expressos em percentagem de peso seco (ps) total de sedimento.

A **matéria orgânica** foi quantificada por combustão total do sedimento seco a 500 ± 25 °C durante um período de 4 horas.

Os resultados são expressos em percentagem de MOT relativamente ao peso seco total do sedimento.

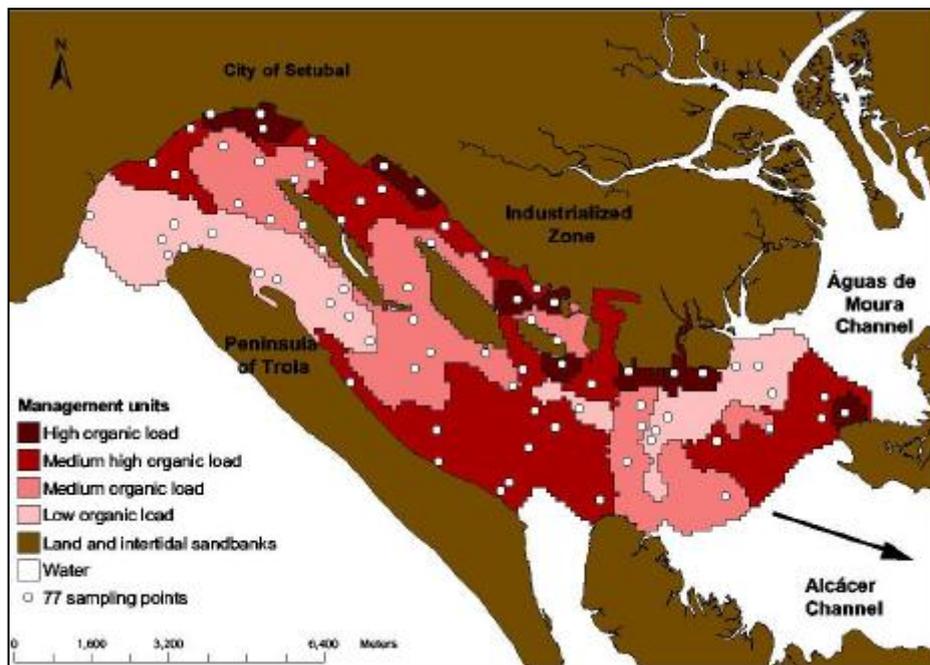
A **contaminação metálica** dos sedimentos foi analisada através da determinação das concentrações dos metais crómio (Cr), cobre (Cu), cádmio (Cd), chumbo (Pb), zinco (Zn) e do metalóide arsénio (As).

Aproximadamente 100 mg de sedimento foi completamente mineralizado com 6ml de ácido fluorídrico HF (40% v / v) e 1ml de água-régia (36% de HCl e 60% de HNO<sub>3</sub>, 3:1 v/v) em bombas de teflon e levado à estufa a 100 ° C durante 1 hora. O conteúdo das bombas de teflon foi dissolvido em HNO<sub>3</sub>, sendo posteriormente aquecido a 75 ° C durante 20 min e diluído em 50 mL de água Milli-Q.

As concentrações de Cr, Cu, Zn, As, Cd e Pb seriam determinadas usando um espectrómetro ICP-MS (Thermo Elemental, X-Series).

Foi utilizada uma curva de calibração de sete pontos no intervalo de 1 a 100 µg L<sup>-1</sup> para quantificar as concentrações de metais. A validade do método foi determinada pelo uso de brancos e do material de referência para os sedimentos: MESS-3 (NRC, Canada).

Uma vez que não foi possível efectuar a leitura das concentrações de metais no sedimento amostrado em tempo útil, foi necessário recorrer á série histórica de concentrações de metais nos sedimentos do Estuário do Sado, amostrados entre Julho e Outubro de 2003 e publicados em Caeiro *et al.* (2005).



**Figura 4** – Pontos de amostragem de sedimento do Estuário do Sado (Caeiro *et al.*, 2005).

Foram seleccionadas as concentrações máximas e mínimas para cada metal de forma a obter uma maior representatividade do estado geral do Estuário do Sado. Os dados referentes às concentrações máximas e mínimas de metais no sedimento do Estuário do Mira foram fornecidos pelo IPIMAR (Caetano M., com. pessoal, 2011)

## **2.4. Análise estatística**

Os dados foram analisados através de métodos não paramétricos após a invalidação da homogeneidade das variâncias calculada pelo teste de LEVENE.

Para a comparação das diferenças entre ambas as estações para cada uma das variáveis foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U e para a verificação da existência de correlações entre as variáveis, a correlação de Spearman.

Estabeleceu-se um nível de significância de 95% ( $\alpha = 0.05$ ) para todas as análises e todas as estatísticas foram realizadas através do software Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## **2.5. Metodologia**

A metodologia do presente trabalho engloba duas componentes: análise sedimentar e análise biológica. Para a análise da qualidade sedimentar serão avaliados os parâmetros: Fracção fina (FF), Matéria orgânica total (MOT) e teor de metais. Para a análise biológica serão recolhidos os dados morfométricos dos organismos e será avaliado o desempenho de dois biomarcadores: metalotioninas (exposição) e histopatologia (efeito) (Figura 5).

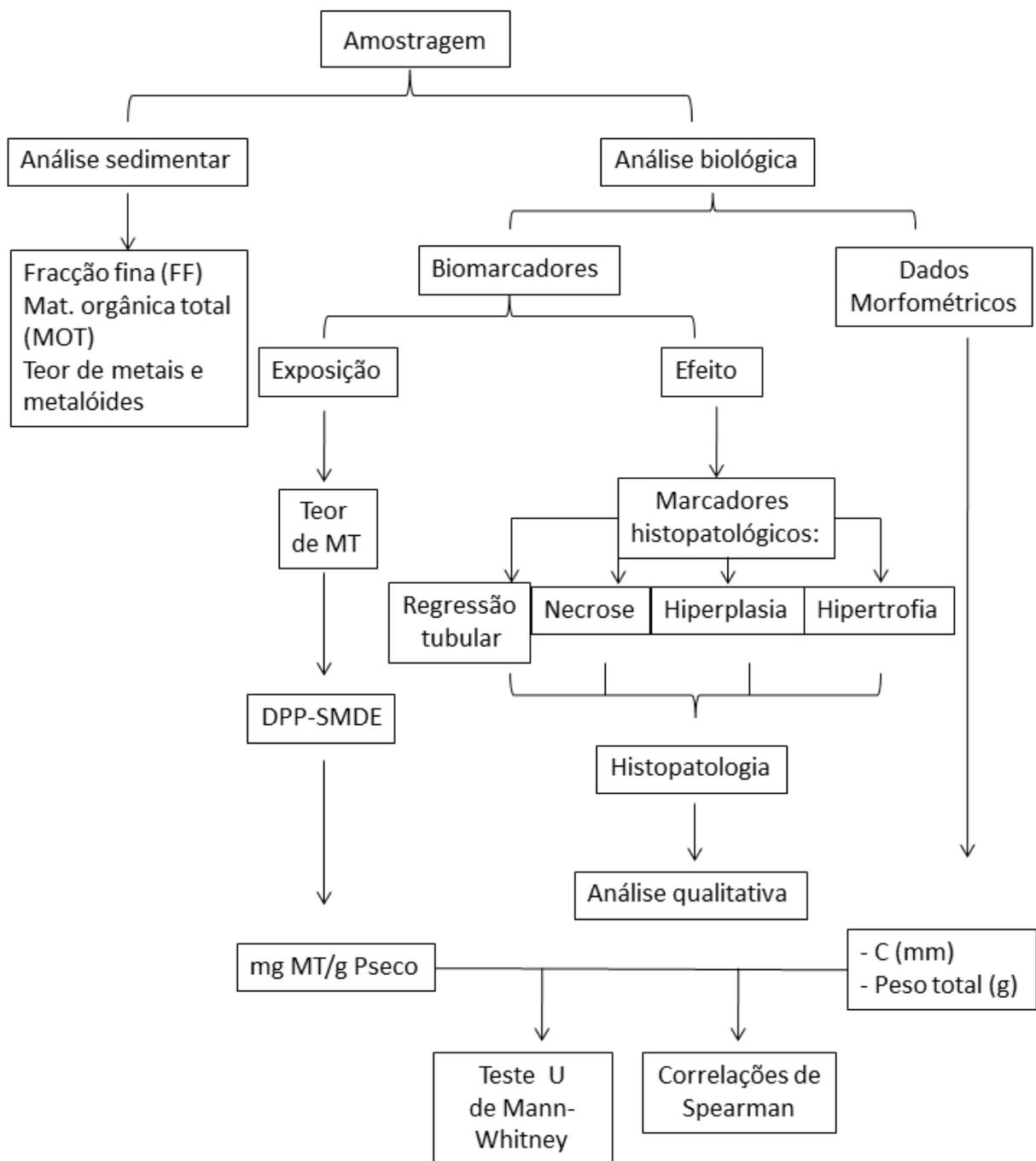


Figura 5 – Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo



### 3. Resultados

#### 3.1. Análise biológica

##### 3.1.1. Dados morfométricos

No anexo 1 são apresentados os resultados dos dados morfométricos de cada indivíduo recolhido de ambas as estações e na tabela 2 encontram-se resumidos os resultados dos dados morfométricos médios obtidos para a estação do Sado e Mira.

**Tabela 2** - Média e desvio padrão do comprimento e peso total dos indivíduos do Estuário do Sado e Mira

	<b>Sado</b>	<b>Mira</b>
<b>Comprimento (mm)</b>	39,0 ± 3,5	46,4 ± 5,3
<b>Peso total (g)</b>	12,7 ± 3,7	20,4 ± 7,4

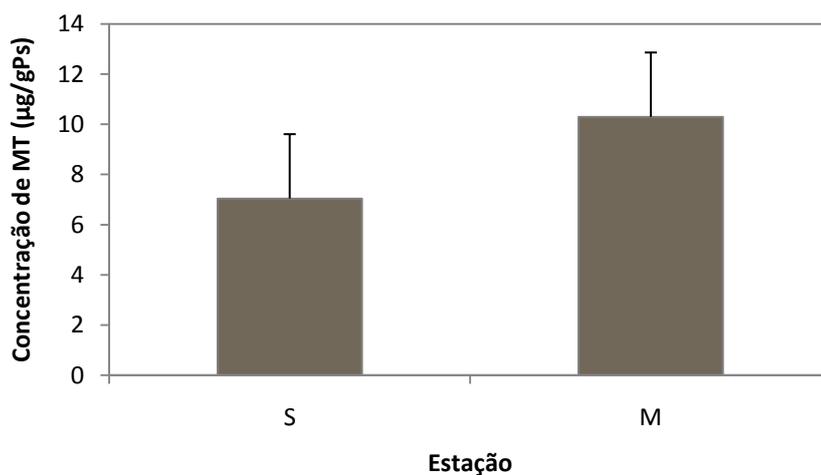
Como é possível verificar, os indivíduos recolhidos no estuário do Mira possuem um comprimento e peso total superiores aos indivíduos recolhidos no estuário do Sado

### 3.1.2. Metalotioninas

Após a leitura das concentrações equivalentes de MT (mg/L) no polarógrafo DPP-SMDE foi calculado o teor de MT associado ao peso seco de cada amostra, e efectuada a média e o desvio padrão do total das amostras, para cada estuário. Na tabela 3 e figura 6 é possível observar os teores médios de MT (mg/g Ps) para a Estação do Sado e para a Estação do Mira:

**Tabela 3** – Média e desvio padrão da concentração média de MT na estação do Sado e do Mira

<b>Estação</b>	<b>Concentração média de MT (mg/g Ps)</b>
Sado (S)	7,0428 ± 2,5622
Mira (M)	10,2965 ± 3,8182



**Figura 6** – Concentração média de MT (mg/g ps) e desvio padrão na estação do Sado (S) e na estação do Mira (M)

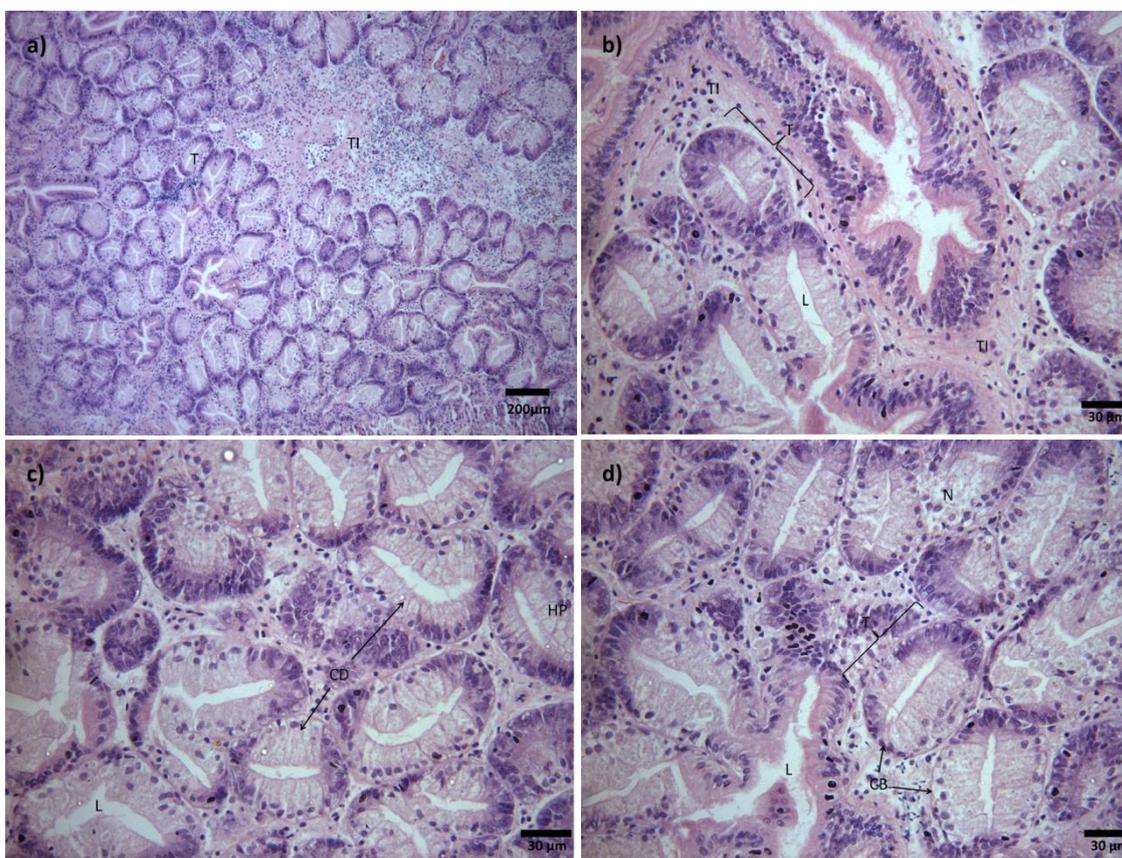
Como é possível verificar, as concentrações médias de MT diferem entre estações, destacando-se a presença de teores superiores de MT na estação do Mira.

### 3.1.3. Histopatologia

Para a análise histopatológica da glândula digestiva da *R. decussatus* seleccionaram-se quatro marcadores histopatológicos para tentar identificar lesões de indução-exposição e alterações na qualidade estrutural do órgão em estudo:

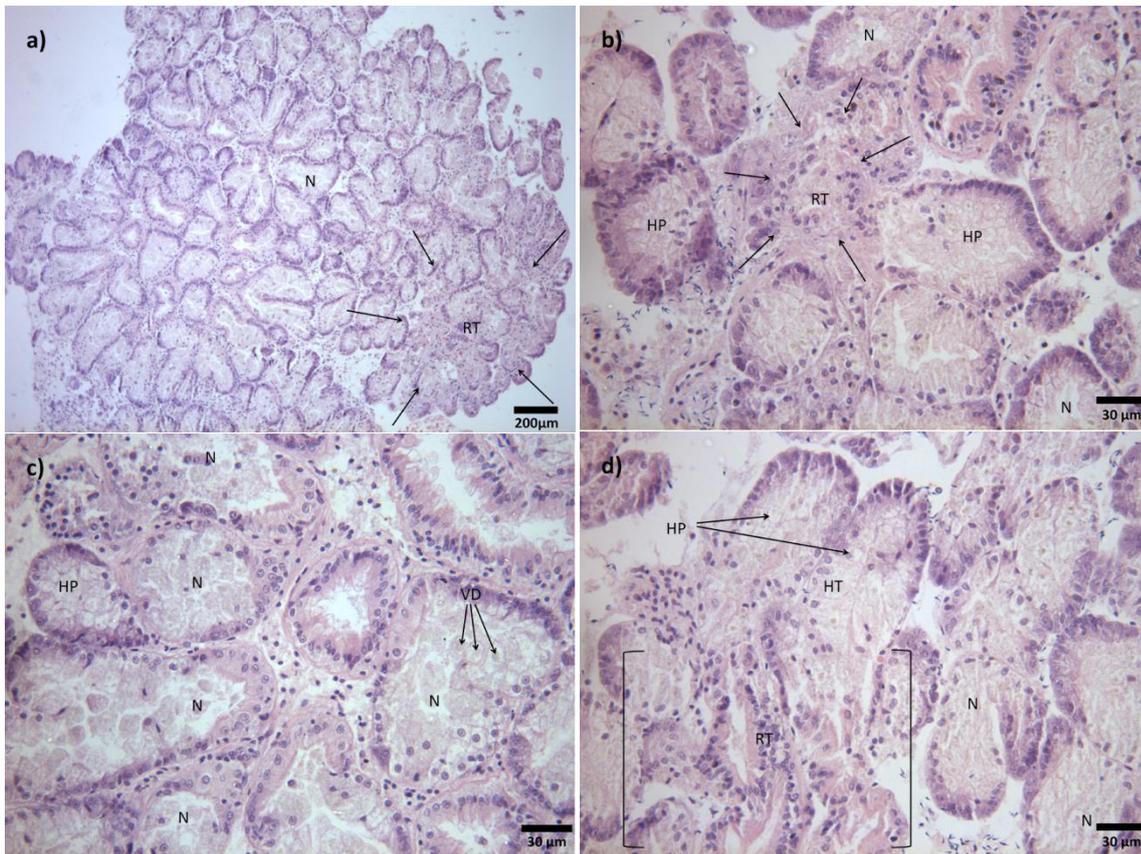
1. Necrose - perda da diferenciação celular dos tubulos; 2. Regressão tubular - perda da diferenciação e da forma dos tubulos; 3. Hiperplasia – proliferação de células digestivas; 4. Hipertrofia – aumento do tamanho normal das células digestivas.

Na figura 7 e 8 é possível observar o aspecto das secções de corte da glândula digestiva dos indivíduos do Estuário do Mira e do Sado respectivamente.



**Figura 7** – Secção histológica da glândula digestiva da espécie *R. decussatus* do Estuário do Mira (H&E)

a)(Amp. 100X) Visualização da estrutura dos túbulos (T) e tecido intersticial (TI) denso b) (amp. 400X) Túbulos (T) bem estruturados com a presença de lúmen (L) no centro. c) (amp. 400X) Diferenciação das células digestivas (CD) e do lúmen nos túbulos e hiperplasia (HP) tubular. d) (amp. 400X) Distinção da camada basal (CB) dos túbulos (T), presença de lúmen (L) na ramificação tubular e foco de necrose (N).



**Figura 8** – Secção histológica da glândula digestiva da espécie *R. decussatus* do Estuário do Sado (H&E)

a) (Amp. 100X) Visualização da estrutura dos túbulos com a presença de focos de necrose (N) e regressão tubular (RT). b) (Amp. 400X) Hiperplasia (HP) das células digestivas, regressão tubular (RT) e focos de necrose (N). c) (Amp. 400X) Presença de necrose (N) em diversos túbulos, com vacúolos digestivos (VD) de grande dimensão e hiperplasia (HP). d) (Amp. 400X) Hipertrófia (HT) e hiperplasia (HP) das células digestivas, regressão tubular (RT) generalizada e vários focos de necrose (N).

Após a análise dos marcadores histopatológicos verificou-se a existência de diferenças significativas entre os organismos de ambas as estações, com incidência de maior número de lesões na glândula digestiva dos indivíduos do Sado. Para esta estação, todos os indivíduos analisados revelaram ausência de diferenciação celular, estados degenerativos da estrutura dos túbulos e proliferação das células digestivas, destacando-se a presença de necroses, regressão tubular e hiperplasia. Em alguns indivíduos pôde observar-se a presença de células digestivas de tamanho anormal (hipertrofia) com vacuolos digestivos de grandes dimensões.

Para a estação do Mira, as lesões foram apenas esporádicas, apresentando grande parte dos indivíduos uma estrutura normal da glândula digestiva, com destaque para a densidade do tecido intersticial, contendo tubulos em forma de bacilo com células vegetativas diferenciadas, visibilidade do

lúmen e para a camada basal bem definida. Não se observaram lesões relacionadas com hipertrofia ou regressão tubular, sendo que a presença de focos de necrose e hiperplasia revelou-se moderada.

Na tabela 4 encontram-se resumidas as lesões histopatológicas encontradas nos organismos analisados.

**Tabela 4** – Marcadores histopatológicos para a análise estrutural da glândula digestiva da *R. decussatus*

Estação	Indivíduo	Marcadores histopatológicos			
		Hiperplasia	Hipertrofia	Necrose	Regressão tubular
Mira	1	±	-	-	-
	2	±	-	±	-
	3	±	-	±	-
Sado	1	+	±	+	+
	2	+	-	++	+
	3	±	+	+	+

Legenda: ++ fortemente presente; + Presente; ± moderadamente presente; - Ausente

Analisando os dados semi-quantitativos presentes na tabela 4, é possível constatar que a regressão tubular e a necrose são as lesões mais frequentes em todos os indivíduos do Estuário do Sado, com destaque para a incidência desta lesão no indivíduo 2. Em contrapartida a hipertrofia destacou-se como o marcador menos presente nos indivíduos da estação do Sado, sendo que apenas o indivíduo 3 revelou sintomas desta lesão. Não se observou qualquer lesão de hipertrofia e regressão tubular para os indivíduos da estação do Mira e os focos de hiperplasia e necrose revelaram-se moderadamente presentes.

### 3.2. Análise sedimentar

Na tabela 5 encontram-se os resultados relativamente á caracterização física dos sedimentos

**Tabela 5** – Caracterização física dos sedimentos

<b>Estação</b>	<b>FF<sup>a</sup> (%)</b>	<b>MOT<sup>b</sup> (%)</b>
Mira	72,45	7,9
Sado	2,53	0,8

**a** Fracção fina (dimensão das partículas < 63 µm)

**b** Matéria orgânica total

Analisando os resultados da tabela 5, é possível verificar a existência de diferenças claras entre os sedimentos de ambos os estuários, destacando-se a presença de elevados teores de matéria orgânica e percentagem de fracção fina no sedimento do estuário do Mira. Em contrapartida, o estuário do Sado possui um sedimento pobre em matéria orgânica e com percentagens de fracção fina muito reduzidas.

Na tabela 6 encontram-se as concentrações máximas e mínimas de metais, registadas no estuário do Sado (Caeiro et al., 2005) e no estuário do Mira (Caetano M., com. pess. 2011)

**Tabela 6** – Concentração mínima e máxima de metais (µg/g Ps sedimento) para cada Estação

<b>Estação</b>		<b>Elementos (µg/g)</b>					
		<b>Cd</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>As</b>
Sado	Min	0,4	3,5	6,4	1,5	1,3	2,4
	Máx	6,4	69	507	191	44	37
Mira	Min	0,062	15	34	16	34	14
	Máx	0,12	23	57	30	44	18

Foi calculado o índice SQG-Q, associado a cada metal, para ambas as estações através das seguintes equações: (Long & MacDonald, 1998):

$$SQG - Q\alpha = \frac{\sum_{i=1}^n PEL - Qi\alpha}{n}$$

Em que:

$$PEL - Qi\alpha = \frac{C\alpha}{PEL}$$

PEL – Q - *Probable Effect Level quotient* para cada contaminante i

C – Concentração de metais na estação de amostragem

PEL - *Probable Effect Level* para cada contaminante

n – nº de contaminantes usados

De acordo com MacDonald *et al.* (2004) uma estação de amostragem pode ser classificada de acordo com três categorias de impacto:

Categoria 1: SQG-Q ≤ 0.1 - Baixo potencial para efeitos adversos

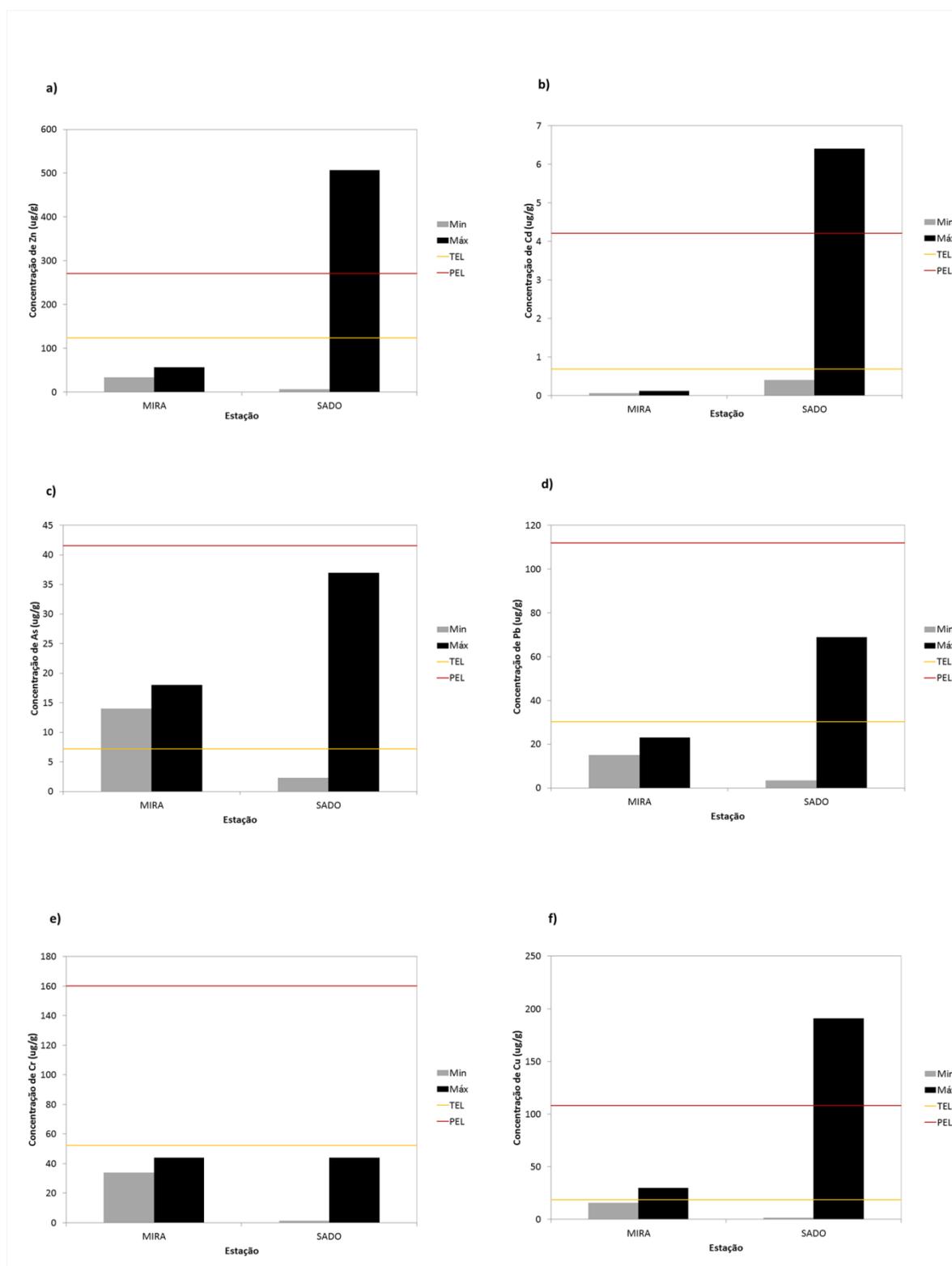
Categoria 2: 1 > SQG-Q > 0.1 - Potencial moderado para efeitos adversos

Categoria 3: SQG-Q ≥ 1 - Potencial para efeitos adversos

Segundo Macdonald *et al.* (1996) os valores-guia de PEL e TEL para os metais em estudo, são os seguintes:

**Tabela 7** – valores de PEL e TEL utilizados no presente estudo (MacDonald *et al.*, 1996).

	Cd	Pb	Zn	Cu	Cr	As
PEL (µgg-1)	4,21	112	271	108	160	41,6
TEL (µgg-1)	0,68	30,2	124	18,7	52,3	7,24



**Figura 9** – Concentração mínima e máxima de metais com respectivos valores de PEL e TEL para o Estuário do Sado e Mira

**a)** Concentração de zinco ( $\mu\text{g/g}$  Ps sedimento) em ambas as estações e respectivos PEL e TEL; **b)** Concentração de cádmio ( $\mu\text{g/g}$  Ps sedimento) em ambas as estações e respectivos PEL e TEL; **c)** Concentração de arsénio ( $\mu\text{g/g}$  Ps sedimento) em ambas as estações e respectivos PEL e TEL; **d)** Concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$  Ps sedimento) em ambas as estações e respectivos PEL e TEL; **e)** Concentração de cromo ( $\mu\text{g/g}$  Ps sedimento) em ambas as estações e respectivos PEL e TEL; **f)** Concentração de cobre ( $\mu\text{g/g}$  Ps sedimento) em ambas as estações e respectivos PEL e TEL

Observando os gráficos representados (figura 9) é possível constatar que o Estuário do Sado registou uma grande amplitude de concentrações de metais, possuindo os teores mínimos de metais mais reduzidos e em simultâneo, os teores máximos mais elevados.

Neste estuário, o zinco, o cobre e o cádmio atingiram valores máximos de concentração superiores ao respectivo PEL, (por ordem decrescente de gravidade), em contrapartida, o crómio atingiu uma concentração máxima abaixo do respectivo TEL. No intervalo entre o TEL e o PEL situaram-se o arsénio e o chumbo.

No estuário do Mira o arsénio e o cobre (por ordem decrescente de gravidade) foram os únicos contaminantes a registar concentrações máximas situadas no intervalo entre o TEL e o PEL, no entanto no caso do arsénio as concentrações mínimas registadas também se mantiveram dentro deste intervalo.

**Tabela 8** - Valores máximos e mínimos do Índice SQG-Q para o Estuário do Mira e do Sado

	<b>Mira</b>	<b>Sado</b>
<b>SQG-Q Min</b>	0,16	0,04
<b>SQG-Q Máx</b>	0,24	1,08

Em relação ao índice de risco ecológico (SQG-Q) (Tabela 8), verificou-se também um maior intervalo de valores possíveis para o Estuário do Sado, sendo que no cenário mais favorável, o SQG-G não registará valores superiores a 0,04 (SQG-Q <0,1) e no cenário menos favorável, o SQG-G poderá atingir valores não inferiores a 1,08 (SQG-G > 1). A mesma variação no índice de risco ecológico não se verifica para o estuário de referência, uma vez que em ambos os cenários o SQG-G se mantém no intervalo  $0,1 < \text{SQG-Q} < 1$ .

### 3.3. Análise Estatística

Analisando os valores de p (tabela 9) resultantes do teste de Levene é possível verificar que existem diferenças entre a estação da Carrasqueira e do Mira em relação ao comprimento dos indivíduos ( $p < 0,05$ ).

Assim, perante a existência de diferenças nas variâncias, não se verificou um dos pressupostos para a aplicação de testes paramétricos, pelo que se recorreu ao uso do teste não paramétrico de Mann-Whitney U para avaliar as diferenças entre ambas as estações para cada uma das três variáveis escolhidas: comprimento (mm), Peso total (g) e teor de MT.

Uma vez que os valores de p para as três variáveis são inferiores a 0,05, é possível aferir que existem diferenças entre as estações em relação ao comprimento (mm), Peso total (g) e teor de MT.

**Tabela 9** – Valores de p para cada teste estatístico e cada variável de ambas as estações

Teste	Variável	p
Levene (paramétrico)	Comprimento (C)	0,000532
	Peso total (Pt)	0,345079
	Teor de metalotioninas (MT)	0,148729
Mann-Whitney U (não paramétrico)	Comprimento (C)	0,000001
	Peso total (Pt)	0,000626
	Teor de metalotioninas (MT)	0,002174

Os resultados do teste de correlação de Spearman são apresentados na tabela 10

**Tabela 10** – Correlações de Spearman entre variáveis ( $p < 0,05$ )

---

<b>Estação</b>	<b>Comprimento (C)</b>	
Sado e Mira	0,870968	<b>Peso total (Pt)</b>
	0,411832	<b>MT</b>
Sado	0,870968	<b>Peso total (Pt)</b>
	0,411832	<b>MT</b>
Mira	0,921380	<b>Peso total (Pt)</b>

---

Verificou-se a existência de uma forte correlação entre o comprimento e o peso total dos indivíduos em ambas as estações, no entanto a estação do Mira apresentou uma correlação ligeiramente superior. De um modo geral existe uma correlação moderada entre o teor de MT e o comprimento dos indivíduos, devido á contribuição exclusiva do estuário do Sado ( $R = 0,411832$ ), não existindo tais correlações para a Estação de Controlo.



## 4. Discussão

Analisando os resultados obtidos para o **biomarcador de exposição**, é possível constatar que embora a estação do Estuário do Sado possua inputs de contaminantes francamente elevados (IH, 1993, Caeiro, 1996, Ferreira, 1998 & Cerejeira *et al.*, 1999) comparativamente com a estação do Estuário do Mira, estas diferenças não se verificaram pelos níveis de MT, uma vez que a Estação do Mira registou valores mais elevados de concentração média de MT ( $10,2965 \pm 3,8182$  mg/g Ps) do que a Estação do Sado ( $7,0428 \pm 2,5622$  mg/g Ps), contrariamente ao que seria de esperar.

Embora muitos estudos tenham demonstrado a indução de MT por metais em vertebrados e invertebrados, a expressão da MT não se revela linear, existindo outros factores alheios à contaminação metálica capazes de induzir a síntese desta proteína. Aqui reside uma importante questão, uma vez que a relevância do uso de MTs como biomarcadores eficazes da presença de metais depende do peso relativo dos factores naturais (Cairns, 1992) e de factores de contaminação que definem o teor da proteína nos tecidos dos organismos. Deste modo, para compreender o papel funcional das MT em bivalves, é necessário conhecer os seus padrões de expressão, bem como os factores que influenciam esta expressão e os mecanismos moleculares que a regulam.

Entre os factores de confusão que afectam as concentrações de MT, alguns são parâmetros do meio envolvente, como a estação do ano, a temperatura (Serafim *et al.*, 2002) e a salinidade (Leung *et al.*, 2002) e outros estão relacionados com as características do indivíduo, particularmente o tamanho (Leung e Furness, 2001a, b; Leung *et al.*, 2001; Serafim *et al.*, 2002; Bebianno *et al.*, 2003), o peso, a idade, os ciclos reprodutivos, o metabolismo e o sexo, podendo em alguns casos, interferir nas concentrações acumuladas de metais (Engel & Brouwer, 1993; Canli *et al.*, 1997; Mouneyrac *et al.*, 2001). Por exemplo, num estudo realizado com *Corbicula fluminea* verificou-se que os níveis de MT atingiram o seu pico em Maio, durante o período de maturação das gónadas, verificando-se um aumento do investimento metabólico para a produção de secreções hormonais durante a actividade reprodutiva até ao período de desova. Correlações idênticas foram verificadas entre o aumento da

temperatura, que desempenha um papel fulcral para o início da actividade reprodutiva de moluscos e o aumento da área correspondente ao tecido reprodutivo. (Baudrimont *et al.* 1997a).

Para além disso, é preciso ter em conta que um factor de confusão pode resultar de uma combinação de factores físicos e biológicos, podendo ocorrer variações intra-específicas e inter-específicas (Baudrimont *et al.*, 1997b; Cotou *et al.*, 2001; Dragun *et al.*, 2004; Raspor *et al.*, 2004). Por exemplo, nos tecidos moles de espécies de mexilhões, a indução MT após a exposição ao Cádmio aumentou cerca de 3-4 vezes (Bebiano & Langston, 1991, 1992), enquanto para *R. decussatus* o aumento líquido de MT foi consideravelmente inferior (Bebiano *et al.* 1993).

As mesmas variações podem ser apreciadas em diferentes tecidos na mesma espécie e de acordo com Romeo & Gnassia Barelli, 1995 as respostas de MT para a *R. decussatus* são geralmente mais significativas nas brânquias, responsáveis pela absorção metálica funcionando como um importante reservatório para o armazenamento de metais, sendo que a MT sequestra uma proporção significativa dos metais acumulados. Deste modo, para além da análise da glândula digestiva, seria interessante verificar os níveis de MT nas brânquias da espécie analisada, para comparar a eficácia de ambos os tecidos em relação à expressão desta proteína.

No presente estudo, foi registado o comprimento e o peso dos indivíduos para analisar a influência das características dos organismos no teor de MT produzido através do R de Spearman. Em ambas as estações foram observadas fortes correlações entre o peso e o comprimento dos indivíduos e de um modo geral verificou-se existência de uma correlação embora pouco significativa entre o tamanho dos organismos e o teor de MT ( $R= 0,411832$ ), no entanto apenas a Estação do Sado (mais contaminada), contribuiu para a obtenção destes resultados, uma vez não foram observadas estas correlações para a Estação de Controlo. De facto, Serafim *et al.* 2002 verificou a influência do comprimento dos mexilhões nas concentrações de MT, para temperaturas entre os 18 e 25 ° C, sendo que os indivíduos de maiores dimensões apresentaram níveis mais elevados de MT do que os indivíduos menores.

Por vezes as concentrações de MT são baixas mesmo na presença de elevadas exposições a metais, provavelmente como resultado de um efeito tóxico, interferindo com a funcionalidade dos processos de desintoxicação. Este fenómeno, que tem sido designado como "*Spill Over*" (Brown & Parsons, 1978) e foi verificado no presente estudo, tem já sido reconhecido em bivalves de água doce analisados em campo (Baudrimont *et al.*, 1999).

Este panorama de resultados tem sido observado por vários autores, por exemplo Martinez *et al.* (1996) enfatizou o facto de que a limitação de indução de MT no anfípode *Echinogammarus echinosetosus* ocorreu perante a maior dose de cádmio testada ( $2000 \mu\text{g l}^{-1}$ ), com níveis que se revelaram bastante tóxicos para esta espécie, causando cerca de 35% de mortalidade.

Outra explicação para este fenómeno, remete para as situações de exposição crónica a metais, em que os organismos desenvolvem mecanismos de adaptação às condições do meio e portanto a produção de MT para depuração deixa de ser tão expressiva. Deste modo, mesmo que o organismo esteja francamente contaminado, por vezes esta evidência não se reflecte pelo teor de MT produzido, uma vez que o organismo provavelmente desenvolveu estratégias de adaptação ao meio, que o permitem viver.

Como foi referido anteriormente, é também importante realçar as situações de exposição de organismos a misturas de contaminantes nos sedimentos, para uma interpretação fidedigna dos resultados de indução de MT.

Num estudo desenvolvido com bivalves sujeitos á exposição por misturas de contaminantes, verificou-se a incapacidade de resposta da MT face a elevados níveis de bioacumulação de metais (Gagné *et al.* 2007).

Por outro lado, diversos autores verificaram que a MT foi induzida por agentes alquilantes (Robson *et al.* 1994), cortisol (Hyllner *et al.* 1989), inflamações/infecções (Coyle *et al.* 1995; Regala & Rice, 2004) e stress oxidativo (Bauman *et al.* 1991).

De acordo com os resultados obtidos num estudo de Costa *et al.* (2009), a indução de MT não pode ser meramente explicada pela presença de metais nos sedimentos ou nos organismos, sendo modulada também pela presença de misturas de contaminantes metálicos e orgânicos.

No que se refere às misturas de metais, poderão ocorrer interacções toxicológicas, que podem produzir diferentes efeitos nos organismos dependendo da sua composição, especiação e concentração (Hagopian-Schlekat *et al.*, 2001).

Analisando a zona de amostragem de sedimento do Estuário do Sado, verifica-se que esta se situa no canal Norte do Estuário, entre a indústria da Lisnave e o Porto de Setúbal e recebe o fluxo residual proveniente do canal de Águas de Moura.

De acordo com Caeiro (2004), as descargas de efluentes próximo da Lisnave possuem misturas complexas de contaminantes, como os metais, os PCB's, os TBT's e os PAH's, sendo que a grande maioria destes contaminantes possuem elevada persistência e são tóxicos para o biota marinho. Após a categorização em clusters dos níveis de carga orgânica associados aos diferentes pontos de amostragem do Estuário do Sado, Caeiro *et al.* (2003) classificou a Zona Norte, como uma zona de "carga orgânica média/elevada". Uma vez que a elevadas cargas orgânicas estão associados baixos níveis de hidrodinamismo (Neves, 1985) e adicionando os fluxos de contaminantes provenientes do canal de Águas de Moura, é de esperar, a deposição de elevados níveis de misturas de contaminantes no sedimento da área em estudo, entre as quais os PAH'S que em estudos anteriores se revelaram supressores da biossíntese de MT mesmo na presença de metais fortemente indutores (Risso-De Faverney *et al.* 2000).

Efectuando uma **análise qualitativa** da glândula digestiva dos indivíduos de ambos os estuários, é possível verificar que os indivíduos do Estuário do Sado possuem maior incidência de lesões do que os indivíduos do Mira, muito provavelmente devido às diferenças na qualidade do ambiente estuarino de ambos os locais. Enquanto os indivíduos do Mira, revelaram apenas alguns focos de necrose e uma ligeira proliferação hiperplásica das células digestivas, os indivíduos do Sado

revelaram uma forte presença de lesões relacionadas com a estrutura dos túbulos (regressão tubular), proliferação das células digestivas (hiperplasia) e de focos de necrose, para além de uma presença moderada de células digestivas de tamanho anormal (hipertrofia) com vacúolos digestivos de grandes dimensões.

Vários estudos têm demonstrado a presença de lesões histológicas em organismos contaminados. Por exemplo, de acordo com Najle *et al.* (2000), a vacuolização das células digestivas de bivalves é mais frequentemente observada em invertebrados aquáticos, sujeitos a níveis tóxicos de metais, podendo interferir nos processos de detoxificação celular.

As ostras americanas (*Virginica crassostrea*) amostradas em locais contaminados com petróleo e metais também apresentaram danos na glândula digestiva (necrose) e nas brânquias (por exemplo, hiperplasia de células epiteliais), que se correlacionaram com as concentrações de cádmio nas águas (Gold-Bouchot *et al.*, 1995).

Os resultados histopatológicos do presente estudo, permitem aferir que o biomarcador de efeito revelou-se eficaz como indicador de stress e coerente com os resultados de contaminação sedimentar. De facto, analisando os valores máximos possíveis de SQG-Q para ambos os estuários, é possível constatar que o Estuário do Sado pode registar o índice de risco ecológico mais elevado (SQG-Q=1,08) e portanto é mais provável a ocorrência de danos nos organismos deste estuário do que nos organismos do Estuário do Mira.

Analisando os resultados de **contaminação sedimentar** por metais, é possível constatar que o Estuário do Sado registou uma grande amplitude de teores de metais, possuindo os teores mínimos de metais mais reduzidos e simultaneamente, os teores máximos mais elevados, facto que pode ser explicado pelas variações no hidrodinamismo do Estuário do Sado, que interferem no grau de deposição de contaminantes no sedimento.

Neste estuário, o zinco, o cobre e o cádmio revelaram-se os metais mais preocupantes (por ordem decrescente de gravidade) tendo atingido valores máximos de concentração superiores ao respectivo

PEL, pelo que é esperada a observação de efeitos adversos no biota exposto a estes metais. Em contrapartida, é pouco provável a ocorrência de efeitos adversos nos organismos expostos ao crómio, uma vez que a concentração máxima registada para este metal, manteve-se abaixo do respectivo TEL. No intervalo entre o TEL e o PEL situaram-se o arsénio e o chumbo, que apesar de não terem registado teores máximos tão preocupantes como o zinco, poderão gerar efeitos nefastos nos organismos associados.

No estuário do Mira o arsénio e o cobre (por ordem decrescente de gravidade) foram os únicos contaminantes a registar concentrações máximas situadas no intervalo entre o TEL e o PEL, no entanto no caso do arsénio as concentrações mínimas registadas também se mantiveram dentro deste intervalo, sendo mais provável a ocorrência de efeitos nos organismos do Mira expostos a este metal.

Analisando os resultados da componente física dos sedimentos, é possível verificar que no local de amostragem, o estuário do Sado possui um sedimento mais arenoso, com percentagens de fracção fina e matéria orgânica muito inferiores ao estuário de referência que possui um sedimento mais vasoso. Em sedimentos vasosos com elevados teores de matéria orgânica, as forças de coesão das partículas impedem a libertação de contaminantes para a coluna de água, diminuindo a sua disponibilidade para o biota. Em contrapartida, os sedimentos mais arenosos, possuem menor capacidade de retenção de contaminantes aumentando a sua disponibilidade para espécies como a *R. decussatus*. Deste modo é de esperar que os organismos do Sado, no local de amostragem seleccionado, sejam mais vulneráveis á contaminação uma vez que se alimentam por filtração das partículas da coluna de água.

## 5. Conclusões e Desenvolvimentos Futuros

Tendo como base a série histórica de concentrações de metais nos sedimentos do Estuário do Sado, publicada em Caeiro *et al.* (2005), é possível concluir que o estuário do Sado é efectivamente mais contaminado por metais, o que se pode traduzir em efeitos adversos para os organismos, em particular para a *R. decussatus*. Embora incompatível com os resultados da concentração de MT, (provavelmente modulada por diversos factores, anteriormente referidos), este facto foi verificado pela análise histopatológica, com a incidência de maior número de danos estruturais nos indivíduos do Sado e pela contaminação sedimentar, uma vez que o sedimento do Sado pode registar os teores mais elevados de metais, sendo que o zinco, o cobre e o cádmio, atingiram concentrações superiores ao respectivo PEL, o que está de acordo com os valores do índice SQG-Q máximo para o Sado (1,08) e Mira (0,24). Desta forma é também possível concluir-se que, perante a complexidade dos ambientes estuarinos, em particular do estuário do Sado, os biomarcadores de efeito, poderão ser mais eficazes enquanto biomarcadores de carácter não-específico.

Uma vez que a *R. decussatus* é uma espécie de elevado interesse comercial, seria interessante em estudos futuros, obter os níveis de bioacumulação de contaminantes nos tecidos dos organismos, bem como as estimativas de consumo da espécie pela população local para efectuar uma avaliação de risco para a saúde humana.



## 6. Referências Bibliográficas

Almeida A. (1998). Estrutura dinâmica e produção da macrofauna acompanhante dos povoamentos de *Zostera noltii* e *Zostera marina* no estuário do rio Mira. Doutorado, Faculdade de Ciências de Lisboa, 363 pp.

Andrade F. (1986). O estuário do Mira: Caracterização geral e análise quantitativa da estrutura dos macropovoamentos bentónicos. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, Faculdade de Ciências de Lisboa, 393 pp.

Antunes M., Lopes Da Cunha P. (2002) Skeletal anomalies in *Gobius niger* (Gobiidae) from Sado estuary, Portugal. *Cybiurn* 26, 179–184.

Baudrimont M., Andres S., Metivaud J., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C., Boudou A. (1999). Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot France). II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472–2477.

Baudrimont M., Lemaire-Gony S., Ribeyre F., Metivaud J., Boudou A. (1997a). Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 118, 361–367.

Baudrimont M., Metivaud J., Maury-Brachet R., Ribeyre F., Boudou A. (1997b). Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096–2105.

Baudrimont M., Montaudouin X., Palvadeau A. (2006). Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): A multivariate field monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 494–502.

Bauman J.W., Liu J., Liu Y.P., Klaassen C.D. (1991). Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 347–354.

Bebiano M.J., Langston W.J. (1991). Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol.* 108, 91–96.

Bebiano M.J., Langston W.J. (1992). Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 103, 79–85.

Bebiano M.J., Langston W.J. (1993). Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *BioMetals* 6, 239–244.

Bebiano M. J., Serafim M. A. (2003). Variation of metallothionein and metal concentrations in a natural clam population of *Ruditapes decussatus*. *Arch. of Environ. Contam. and Toxicol.* 44, 53-56.

Bigot A., Doyen P., Vasseur P., Rodius F. (2009). Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 382–387.

Blackmore G, Morton B, Huang, Z.G. (1998) Heavy metals in *Balanus amphitrite* and *Tetraclita squamosa* (Crustacea: Cirripedia) collected from the coastal waters Xiamen, China. *Mar. Pollut. Bull.*, 36, 32-40.

Bouquegneau J.M., Gerday C., Disteche A. (1975). Fish mercury binding thionein related to adaptation mechanisms. FEBS. LETT. 55, 173-177.

Brown D. A., Parsons T. R. (1978). Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. J. Fish. Res. Can. 35, 880-884.

Cabral H.N. (2000). Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. J. Fish Biol. 57, 1550–1562.

Caeiro S. (1996). Actividade Depuradora Bacteriana na Interface Água/Sedimento em Ambientes Sedimentares Estuarinos com Diferentes Cargas Orgânicas. Master Thesis. Universidade de Aveiro.

Caeiro S., Costa M.H., Paíño M., Ramos T.B. (2002). Sado Estuary Environmental Management: A GIS Approach. In Proceedings of Euroworkshop ECO-GEOWATER GI and Water Resources Assessment, Geographical Information Systems International Group GISIG. Oxford, England, pp. 1–13.

Caeiro S., Costa M.H., Ramos T.B., Fernandes F., Silveira N., Coimbra A., Medeiros G., Painho M. (2005). Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. Ecological Indicators 5, 151–169.

Caeiro S., Goovaerts P., Painho M., Costa M. H. (2003). Delineation of Estuarine management areas using multivariate geostatistics: The case of Sado estuary. Environ. Sci. and Technol. 37, 4052-4059.

Caeiro S., Mourão I., Costa M. H., Painho M., Ramos T. B., Sousa S. (2004). Application of the DPSIR model to the Sado Estuary in a gis context- social and economical pressures. F. Toppen, P.Prastacos (Ed.) Proceedings of 7th AGILE Conference on Geographic Information Science 29 April - 1 May, Greece, Heraklion, pp. 391 – 402.

Cairns J. Jr., McCormick P.V. (1992). Developing an ecosystem-based capability for ecological risk assessments. Environ. Profession. 14, 186-196.

Cajaraville M.P., Abascal I., Etxeberria M., Marigomez I. (1995). Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: Time and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. Environ. Toxicol. Water Qual. 10, 1–8.

Canli M., Stagg R.M., Rodger G. (1997). The induction of metallothioneins in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothioneins and metals. Environ. Pollut. 96, 343–350.

Catarino J., Peneda M., Santana F. (1987). Estudo do Impacte da Indústria no Estuário do Sado – estimativas da poluição afluyente ao sistema, LNETI, Lisboa, Portugal.

Cerejeira M. J., Pereira T., Espirito-Santo J., Viana P., Brito F., Morbey M. (1999). Influência da utilização de pesticidas em arrozais para o meio aquático. Estudos de campo e de laboratório. Em: Santana F., Vasconcelos L., Partidário M. R., Seixas M. J., Sobral M. P. (Ed). *Proceedings of 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*. New University of Lisbon, Lisbon, Vol. 2, pp. 133 – 142.

Chapman P.M., Anderson J. (2005): A decision-making framework for sediment contamination. Integr. Environ. Assess. Manage. 1, 163–173.

Chapman P.M., Hollert H., (2006). Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad or possibly even a hexad? *J. Soils Sed.* 6, 4–8.

Chapman P.M., McDonald B.G., Lawrence G.S. (2002): Weight of evidence frameworks for sediment quality and other assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8, 1489–1515.

Chapman P.M., Wang F. (2001). Assessing Sediment Contamination in Estuaries. *Environ. Toxicol. and Chem.* 20, 3-22.

Choi K., Lehmann D.W., Harms C.A., Law J.M. (2007). Acute hypoxia-reperfusion triggers immunocompromise in Nile tilapia. *J Aquat. Anim. Health* 19, 128-140.

Comeleo R. L., Paul J. F., August P. V., Copeland J., Baker C., Hale S. S., Latimer R. W. (1996). Relationship between watershed stressors and sediment contamination in Chesapeake Bay estuaries. *Lands. Ecol.* 11, 307-319.

Costa M.J., Bruxelas A., Rosado D. (1987). Ictiofauna do estuário do Mira, abundância e diversidade. 2º Congresso sobre o Alentejo. Beja, pp. 225-230.

Costa P.M., Caeiro S., Diniz M.S., Arteaga J.L., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., Dell Valls A., Costa M.H. (2009). Biochemical endpoints on juvenile *Solea senegalensis* exposed to estuarine sediments: the effect of contaminant mixtures on metallothionein and CYP1A induction *Ecotoxicology.* 18, 988–1000.

Costa, P.M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., Del- Valls, T.A., Costa, M.H., (2008). Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants. *Mutat. Res.* 654, 29–37.

Cosson R.P. (2000). Bivalve metallothioneins as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cell. Mol. Biol.* 46, 295–309.

Cotou E., Vagias C., Rapti T., Roussis V. (2001). Metallothionein levels in the bivalves *Callista chione* and *Venus verrucosa* from two Mediterranean sites. *Z. Naturforsch.* 56, 848–852.

Coyle P., Philcox J.C., Rofe A.M. (1995). Metallothionein induction in cultured rat hepatocytes by arthritic rat serum, activated macrophages, interleukin-6, interleukin-11 and leukaemia inhibitory factor. *Inflamm. Res.* 44, 475–481.

Cunha P. L. (1994). Ictiofauna do estuário do Sado. PhD Thesis, Universidade de Lisboa, Lisboa.

Dallinger R. (1996). Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113, 125–33.

Dauer D. M., Weisberg S. B., Ranasinghe J. A. (2000). Relationships between benthic community condition, water quality, sediment quality, nutrient loads, and land use patterns in Chesapeake Bay. *Estuaries* 23, 80-96.

DelValls T.A., Chapman P.M. (1998) Site-specific sediment quality values for the Gulf of Cádiz (Spain) and San Francisco Bay (USA), using the sediment quality triad and multivariate analysis. *Cienc. Mar.* 24,313–336.

Dragun Z., Erk M., Raspor B., Ivankovic D., Pavicic J. (2004). Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Environ. Intern.* 30, 1019–1025.

El-Shenawy N.S., Greenwood R., Abdel-Nabi I.M. (2007). Histological responses of marine mussel *Mytilus edulis* to long-term exposure to sublethal-level of lindane and atrazine. Act. Zoolog. Sinic. 53, 899-909.

Engel D.W., Brouwer M. (1993). Crustaceans as models for metal metabolism: 1. Effects of the moult cycle on blue crab metal metabolism and metallothioneins. Mar. Environ. Res. 35, 1–5.

EPA, (1998) Guidelines for Ecological Risk Assessment, Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Etxeberria M., Cajaraville M.P., Marigomez I. (1995). Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai Estuary (Biscay Coast, Iberian Peninsula). Mar. Pollut. Bull. 30, 599–603.

Etxeberria M., Sastre I., Cajaraville M.P., Marigomez I.(1994). Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 338–345.

Ferreira C. (1994). Estrutura trófica da comunidade macrobentónica dos povoamentos de *Zostera noltii* (Hornem) e *Zostera marina* do estuário do Rio Mira. Dissertação de candidatura ao grau de Mestre, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 115 pp.

Ferreira A.M., Vale C. (2001) Seasonal and inter-annual variations of PCB and DDT contents in the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado Estuary (Portugal). Cienc. Marin., 27, 255-268.

Ferreira C.M. (2004). Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. Em: Ranzani-Paiva M.J.T., Takemoto R.M., Lizama M.A.P. (Eds). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo:Varela, pp. 273-284.

Ferreira F. (1998) Revisão do Plano de Ordenamento da Reserva Natural do Estuário do Sado. Reserva Natural do Estuário do Sado.

Ferreira J.G., Simas T., Nobre A., Silva M.C., Shifferegger K., Lencart-Silva J. (2003). Identification of Sensitive Areas and Vulnerable Zones in Transitional and Coastal Portuguese Systems: Application of the United States National Estuarine Eutrophication Assessment to the Minho, Lima, Douro, Ria de Aveiro, Mondego, Tagus, Sado, Mira, Ria Formosa and Guadiana Systems. Instituto da Agua and Institute of Marine Research, Lisboa, Portugal.

Gagné F., Blaise C., André C., Pellerin J. (2007). Implication of site quality on mitochondrial electron transport activity and its interaction with temperature in feral *Mya arenaria* clams from the Saguenay Fjord. Environ. Res. 103, 238–246.

Garcês J., Costa M.H. (2009). Trace metals in populations of *Marphysa sanguinea* (Montagu, 1813) from Sado estuary: Effect of body size on accumulation. Sci. Mar. 73, 605–616.

Geffard A., Amiard J. C., Amiard-Triquet C. (2002). Kinetics of metal elimination in oysters from contaminated estuaries. Comparative Biochemistry and Physiology, C 131, 281–293.

Geret F. (2000). Synthèse de métallothionéines chez deux bivalves (l'huître et la moule) en réponse à une contamination métallique par la voie directe et par la voie trophique. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 307pp.

Geret F., Serafim A., Bebianno M.J. (2003) Variation of Antioxidant Enzyme Activities, Metallothioneins and Lipid peroxidation levels in *Ruditapes decussatus*. *Ecotoxicology*. 12, 417-426.

Gold-Bouchot G., Simá-Alvarez R., Zapata-Pérez O., Güemez-Ricalde J. (1995). Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 439–445.

Hagopian-Schlekat T., Chandler G.T., Shaw T.J. (2001). Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Research* 51, 247–264.

Hammer D.H. (1986). Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913 - 951.

Hamza-Chaffai A., Amiard J.C., Pellerin J., Joux L., Berthet B. (2000). The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 127, 185–197.

Hinton D.E., Baumann P.C., Gardner G.R. et al. Histopathology biomarkers. Ed: Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. (1992) Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. Florida: Lewis, p.155-209.

Howard D.W, Lewis E.J., Keller B.J., Smith C.S. (2004). Histological techniques for marine bivalve mollusks and Crustaceans. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS 5, 218 pp.

Hyllner S.J., Andersson T. Haux C. Olsson P.E. (1989). Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 139, 24-28.

IH (1993) Poluição por Hidrocarbonetos – Zonas Costeiras e Interiores – 1991/1992. Relatório Técnico Final – QP.02/93, Instituto Hidrográfico, Lisboa, Portugal.

Isani G., Andreani G., Kindt M., Carpena E. (2000). Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell. Mol. Biol.* 46, 311–330.

Jonnalagadda P.R., Rao B.P. (1996). Histopathological changes induced by specific pesticides on some tissues of the fresh water snail, *Bellamya dissimilis* Muller. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 648–654.

Kito H., Ose Y., Mizuhira V., Sato T., Ishikawa T., Tazawa T. (1982). Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepato-pancreas. *Comparative Biochemistry Physiology* 73, 121–127  
Kojima Y. (1991) *Methods Enzymol.* 205, 8-10.

Kraak M.H.S., Schoon H., Peeters W.H.M., van Straalen N.M. (1993). Chronic ecotoxicity of mixtures of Cu, Zn, and Cd to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 315–327.

Langston W.J., Bebianno M.J., Burt G.R. (1998). Metal handling strategies in molluscs. Em: Langston W.J., Bebianno M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 219–283.

Lazo J. S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A. E., Choo K. H., Pitt B. R. (1995). Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J. Biol. Chem.* 270, 5506-5510.

Lee, B.G., Lee J.S., Luoma S.N., Choi H.J., Koh. C.H. (2000). Influence of acid-volatile sulfide and metal concentrations on metal bioavailability to marine invertebrates in contaminated sediments. *Environ. Sci. Tech.* 34, 4517-4523.

Leung K.M.Y., Furness R.W. (1999). Effects of animal size concentrations of metallothionein and metals in periwinkles *Littorina littorea* collected from the Firth of Clyde, Scotland. *Mar. Poll. Bull.* 39, 126–136.

Leung K.M.Y., Furness R.W. (2001a). Survival, growth, metallothionein and glycogen levels of *Nucella lapillus* (L.) exposed to sub-chronic cadmium stress: The influence of nutritional state and prey type. *Mar. Environ. Res.* 52, 173–194.

Leung K.M.Y., Furness R.W. (2001b). Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere* 44, 321–325.

Leung K.M.Y., Morgan I.J., Wu R.S.S., Lau T.C., Svavarsson J., Furness R.W. (2001). Growth rate as a factor confounding the use of the dogwhelk *Nucella lapillus* as biomonitor of heavy metal contamination. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 221, 145–159.

Leung K.M.Y., Svavarsson J., Crane M., Morrith D. (2002). Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwelk *Nucella lapillus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 274, 175–189.

Ley H.L., Failla M.L., Cherry D.S. (1983). Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 74, 507–513.

Linde A.R., Sanchez-Galan S., Klein D., Garcia-Vazquez E., Summer K.H. (1999). Metallothionein and Heavy Metals in Brown Trout (*Salmo trutta*) and European Eel (*Anguilla anguilla*): A Comparative Study. *Ecotox. Environm. Saf.* 44, 168 – 173.

Long E.R., Field L.J., MacDonald D.D. (1998) Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines. *Environ Toxicol. Chem.* 17,714–727.

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

Lowe D. M. (1988) Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 91-100.

Lowe D.M., Clarke K.R. (1989) Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 15, 345-358

MacDonald D.D, Carr S., Calder F., Long E., Ingersoll C. (1996). Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology.* 5, 253-278.

MacDonald D.D., Carr R.S., Eckenrod D., Greening H., Grabe S., Ingersoll C.G., Janicki S., Janicki T., Lindskoog R.A., Long E.R., Pribble R., Sloane G., Smorong D.E. (2004). Development, evaluation, and application of sediment quality targets for assessing and managing contaminated sediments in Tampa Bay, Florida. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 147-161.

Margoshes M., Vallee B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc 79, 4813.

Marigomez I., Cajaraville M.P., Angulo E. (1990). Histopathology of the digestive gland-gonad complex of the marine prosobranch *Littorina littorea* exposed to cadmium. Dis. Aquat. Org. 9, 229–238.

Marigomez I., Kortabitarte M., Dussart G.B.J. (1998). Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 167–176.

Marigomez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E., Giamberini L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microsc. Res. Tech. 56, 358–392.

Martinez M., Delramo J., Torreblanca A., Pastor A., Diazmayans J. (1996). Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*. J. Environ. Sci. Health Part A Environ. Sci. Eng. A 31, 1605-1617.

Martoja R., Martoja M. (1967). Initiation aux Techniques de l'Histologie Animal. Masson & Cie, Paris, 345 pp.

Morales A.E., Pérez-Jiménez A., Hidalgo M.C., Abellán E., Cardenete G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comp. Biochem. Physiol. C 139, 153–161.

Mouneyrac C., Triquet-Amiard C., Amiard J.C., Rainbow P. (2001). Comparison of metallothionein concentration and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. Comp. Biochem. Physiol. C 129, 193–209.

Muto N., Ren H.W., Hwang G.S., Tominaga S., Itoh N., Tanaka, K. (1999). Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air pumping stress, dexamethasone, and metals. *Comp. Biochem Physiol.* 122, 75–82.

Najle R., Elissondo M., Gentile S., Gentile M., Vacarezza G., Solana H. (2000). Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to cadmium. *Sci. Total Environ.* 247, 263–268.

Neves R. J. J. (1985). Biodimensional model for residual circulation in coastal zones: Application to the Sado Estuary. *Annales Geophysicae* 3, 465-472.

Nolan C. V., Duke E. J. (1983) Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis*: Involvement of metallothioneins and heavy molecular weight proteins. *Aquat. Toxicol* 4, 153-163.

Nordberg M. (1998).Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46, 243–254

NRC (1987): Committee on Biological Markers of the National Research Council, Biological markers in environmental health research, *Environ. Health Perspect.* 743 pp.

Oikawa S., Kurasaki M., Kojima Y., Kawanishi S. (1995). Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry* 34, 8763-8770

Olafson R.W., Thompson A.J. (1974). Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.* 28, 83-86

Pires, P.C.N. (2005) Desenvolvimento de uma metodologia de avaliação de riscos ambientais para apoiar a elaboração de planos de emergência. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Sistema de Informação Geográfica. Instituto Superior de Estatística e Gestão de informação da Universidade Nova Lisboa. 159 pp.

Painho M., Vasconcelos L. T., Farral H. (1996). Tendências evolutivas territoriais em gestão ambiental: O caso do Estuário do Sado em: ed. Santana F., Vasconcelos L., Partidário M. R., Seixas M. J., Sobral M. P. Proceedings 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Vol 2. 20 – 22 Outubro, Lisboa. 637 - 646.

Peakall D.W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment Toxicol Ecotoxicol News 1, 55–60.

Phillips D. J. H. (1977). The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in the marine and estuarine environments— A review. Environ. Pollut. 13, 281-317.

Picado A.M., Le Gal Y. (1990) Assessment of industrial sewage impacts by adenylate energy charge measurements in the bivalve *Cerastoderma edule*. Ecotoxicol. Environm. Saf. 19, 1-7.

Queralt I., Barreiros M.A., Carvalho M.L., Costa M.M. (1999). Application of different techniques to assess sediment quality and point source pollution in low level contaminated estuarine recent sediments (Lisboa coasts Portugal). The Science of the Total Environment 241, 39-51.

Raimundo J., Costa P.M., Vale C., Costa M.H., Moura I. (2010). Metallothioneins and trace elements in digestive gland, gills, kidney and gonads of *Octopus vulgaris* (Portugal). Comp. Biochem. Physiol., C 152 139–146.

Rainbow P.S. (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Mar. Poll. Bull. 31, 183-192.

Raspor B., Dragun Z., Erk M., Ivankovic D., Pavicic, J. (2004). Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? Sci. Total Environ. 333, 99–108.

Regala R.P., Rice C.D. (2004). Mycobacteria, but not mercury, induces metallothionein (MT) protein in striped bass, *Morone saxatilis*, phagocytes, while both stimuli induce MT in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, phagocytes. Mar. Environ. Res. 58, 719–723.

Regoli F. (1998). Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 48–63.

Rezende C.E., Lacerda L.D. (1986) Metais pesados em mexilhões *Perna perna* no litoral do Estado do Rio de Janeiro. Rev. Brasil. Biol. 46, 239-247.

Risso-de Faverney C., Lafaurie M., Girard J-P., Rahmani R. (2000). Effects of heavy metals and 3-methylcholanthrene on expression and induction of CYP1A1 and metallothionein levels in trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocyte cultures. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2239–2248.

Romeo M., Gnassia-Barelli M. (1995) Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper or zinc. Comp. Biochem. Physiol. C 111, 457-463.

Rosado M.C., Bruxelles A.T., Castro J.J. (1993). Efeitos ecológicos da exploração comercial de casulo e lingueirão e dinâmica da comunidade de macrofauna acompanhante numa praia arenosa do estuário do Sado Estudos de Biologia e Conservação da Natureza n.9, SNPRCN, Lisboa. 28 pp.

Sato M., Bremner I. (1993). Metallothionein and oxygen radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 325-337.

Serafim M.A., Company R.M., Bebianno M.J., Langston W.J. (2002) Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar Environ Res.* 54, 361– 365.

Simes D. C., Bebianno M. J., Moura J. J. G. (2003). Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.* 63, 307-318.

Silva de Almeida M.J. (2000). Estudos dos fluxos de nutrientes azotados nos Sapais do estuário do Mira. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, Faculdade de Ciências de Lisboa, 234 pp.

Stegeman J.J., Brouwer M., Richard T.D.G., Forlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., van Veld P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Em: Huggett R.J., Kimerly R.A., Mehrle P.M. Jr, Bergman H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.

Stentiford G.D., Longshaw M., Lyons B.P., Jones G., Green M., Feist S.W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.* 55, 137–159.

Syasina I.G., Vaschenko M.A., Zhadan P.M. (1997) Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia: Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. Mar. Environ. Res., 44, 85-98.

Usheva L.N., Frolova L.T. (2006) Morphofunctional Changes of Digestive Gland in the Bivalve Mollusc *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) at Norm and at Parasitic Invasion by Trematodes. Biol. Morya 32, 115–124.

Vega M.M., Marigomez J.A., Angulo E. (1989). Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. Mar. Biol. 103, 547–553.

Viarengo A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. Rev. Aquat. Sci. 1, 295-317.

Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cell. Mol. Biol. 46, 407-417.

Viarengo, A., Moore M. N., Pertica M., Mancinelli G., Zanicchi G., Pipe R. K. (1985) Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussel: The role of lysosomes and thioneins. Sci. total Environ. 43, 135-145.

Vilela H. (1950). Vida bentónica de *Tapes decussatus* (L.). Arq. Museu Bocage, 21, 1-120.

Wenning R. J., Ingersoll C. G. (Editor) (2002). Executive Summary of the SETAC Pellston Workshop on Use of Sediment Quality Guidelines and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL, USA.

WHO (1993): International Programme on Chemical Safety (IPCS), Biomarkers and risk assessment: concepts and principles, Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wilson, J. G., Jeffrey, D. W. (1987). Europe Wide Indices for Monitoring Estuarine Quality. Em: K. Kramer (Ed.). *Biological Indicators of Pollution*. Royal Irish Academy, Dublin, England, pp. 225-242.

Wright P., Mason C.F. (1999). Spatial and seasonal variation in heavy metals in the sediments and biota of two adjacent estuaries, the Orwell and the Stour, in eastern England. *Sci. Total Environ.* 226, 139-156.

Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigómez I. (2007) Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere* 70, 144–154.

Zaldibar B., Cancio I., Soto M., Marigómez I. (2008) Changes in cell-type composition in digestive gland of slugs and its influence in biomarkers following transplantation between a relatively unpolluted and a chronically metal-polluted site. *Environ. Pollut.* 156, 367–379.

## ANEXOS

Anexo 1- Comprimento e peso total dos indivíduos do estuário do Sado (n=21) e Mira (n=14)

SADO		MIRA	
C (mm)	Pt (g)	C (mm)	Pt (g)
45,0	20,82	46,4	21,09
39,0	15,30	49,8	22,70
38,3	10,58	48,5	20,41
37,7	11,12	47,8	20,80
41,9	13,24	46,4	20,16
43,2	17,48	42,9	15,37
46,3	18,67	46,8	20,80
35,3	9,42	48,5	25,38
36,1	9,19	43,5	16,99
41,6	15,35	46,3	19,32
34,4	9,50	40,8	14,48
35,5	8,63	57,6	39,62
37,0	10,64	34,6	6,78
38,0	10,26		
40,5	14,47		
41,6	14,25		
41,6	17,30		
40,0	12,85		
34,9	8,93		
38,0	11,84		
34,0	7,15		

**Anexo 2-** Concentração de metalotioninas ( $\mu\text{g/g Ps}$ ) registada para os indivíduos do estuário do Sado ( $n=21$ ) e do Mira ( $n=14$ )

---

<b>SADO</b>	<b>MIRA</b>
[MT] ( $\mu\text{g/g Ps}$ )	[MT] ( $\mu\text{g/g Ps}$ )
6,9374	6,4444
8,6088	4,8711
4,7718	2,1613
10,0377	2,8970
9,8839	3,8336
7,1123	2,5313
3,8339	3,6064
2,2433	2,2870
2,0972	4,5127
4,0654	7,1926
8,9424	4,6357
8,0916	4,0118
9,3791	3,9829
7,9750	
9,5382	
7,8740	
4,4532	
10,2656	
6,2186	
9,0387	
6,5314	

---

