

**FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

***PODERÁ *Nassarius reticulatus* (L.) SER USADO COMO  
BIOINDICADOR DA CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO?***

**Joana Maria Frias Medeiros de Pimenta**

**Dissertação apresentada para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia do Ambiente**

(Ramo de Gestão e Tratamento de Resíduos Industriais)

Realizada sob a orientação de:

**Professor Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso**  
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutor Rui Alfredo da Rocha Boaventura**  
Departamento de Engenharia Química da  
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Professora Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira**  
Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Dezembro de 2007**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Carlos Miguez Barroso, orientador desta dissertação, pelo incentivo, confiança, disponibilidade e apoio científico manifestados ao longo da realização deste trabalho, bem como pela amizade sempre presente.

Ao Doutor Rui Boaventura, co-orientador desta dissertação, pelas dúvidas esclarecidas, pela revisão do texto e sugestões apontadas e por todo o apoio e disponibilidade demonstrada ao longo da elaboração do presente trabalho.

À Professora Doutora Eduarda Pereira, co-orientadora desta dissertação, pelo acolhimento, pela atenção e pelas facilidades concedidas, e também por toda a cooperação prestada indispensáveis para o êxito da realização desta tese.

Às minhas colegas e amigas, Miléne e Isabel, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro pela ajuda, pelo apoio e pela camaradagem dispensados durante o trabalho de laboratório.

Aos meus colegas, Mónica, Pedro Pato, Paula, Cláudia e Luciana, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro por todo o encorajamento e pela colaboração prestada.

À D. Maria José Mota pela simpatia, apoio e disponibilidade sempre demonstrados.

À minha amiga Luísa que tão prontamente se disponibilizou para ajudar no que fosse preciso.

Ao Tito, aos meus pais e irmãos por terem estado presentes em todos os momentos e pela força e incentivo transmitidos ao longo deste percurso.

## RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se estudar a possível utilização do gastrópode prosobrânquio *Nassarius reticulatus* (L.) como espécie indicadora da contaminação por mercúrio (Hg). Colheram-se animais desta espécie e sedimentos ao longo da costa Portuguesa e determinou-se o mercúrio total e orgânico nos sedimentos e tecidos daquele gastrópode. O mercúrio total foi também analisado nas conchas e opérculos de alguns animais e constatou-se que o mercúrio apresenta concentrações mais elevadas nos tecidos. Ao longo da costa Portuguesa as concentrações de mercúrio total nos sedimentos variaram entre 0,02 e 0,87  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) e as concentrações mais baixas foram observadas nas estações de amostragem localizadas fora dos estuários. Os valores de concentração de mercúrio orgânico nos sedimentos foram sempre abaixo do limite de detecção, representando menos de 1,5% da concentração de mercúrio total. As concentrações de mercúrio total nos tecidos de *Nassarius reticulatus* variaram entre 0,06 e 0,83  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nas fêmeas e entre 0,07 e 1,02  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nos machos e foram geralmente mais baixas no interior dos sistemas estuarinos. Os valores de concentração de mercúrio orgânico variaram entre 0,027 e 0,51  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nas fêmeas e entre 0,025 e 0,75  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nos machos. As concentrações de mercúrio total e orgânico foram similares para os dois sexos em cada estação de amostragem.

Neste estudo o aspecto com maior relevância foi o facto da concentração de mercúrio total nos tecidos de *Nassarius reticulatus* apresentar geralmente valores mais elevados fora dos estuários, e também o facto dos valores de concentração de mercúrio inorgânico e orgânico nos tecidos do animal serem inversamente correlacionados com a concentração de mercúrio total nos sedimentos. Verificou-se, ainda, que o mercúrio orgânico representa, em média, 59% do mercúrio total dos tecidos e que esta percentagem está positivamente correlacionada com o teor de mercúrio total nos tecidos, sendo geralmente superior fora dos estuários.

Realizou-se também um estudo laboratorial para avaliar se pode ocorrer acumulação de mercúrio inorgânico por *Nassarius reticulatus* a partir dos sedimentos, simulando-se condições próximas das encontradas na costa Portuguesa, não só no que respeita à

composição granulométrica dos sedimentos dos diferentes habitats em que *N. reticulatus* foi colhido, como também relativamente à contaminação por mercúrio. Verificou-se que, comparando com o controlo, não ocorre acumulação de mercúrio inorgânico por *N. reticulatus* a partir dos sedimentos ao fim de 20 dias de experiência.

A correlação negativa encontrada entre a concentração de mercúrio nos sedimentos e nos tecidos de *Nassarius reticulatus* é discutida no presente trabalho. É possível que este facto resulte, em parte, de uma diferente contaminação por mercúrio orgânico fora e dentro dos estuários hipoteticamente relacionada com dietas distintas nos dois tipos de habitats (estuarinos e não estuarinos), uma vez que *N. reticulatus* é uma espécie necrófaga e a composição da sua dieta depende dos animais que morrem nas diferentes comunidades. No entanto, este aspecto só por si não explica totalmente a relação inversa encontrada entre a concentração de mercúrio nos sedimentos e no gastrópode e mais estudos são necessários para esclarecer este aspecto.

Conclui-se que *Nassarius reticulatus* não é um bom indicador da contaminação por mercúrio inorgânico dos sedimentos. No entanto, esta espécie poderá ser útil para avaliar a presença de mercúrio nos ecossistemas e para compreender melhor a forma como este metal pode ser transferido ao longo da cadeia trófica, tendo em consideração a dieta necrófaga que este molusco apresenta.

## ABSTRACT

The focus of this work is to explore the use of the prosobranch gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) as an indicator of mercury (Hg) contamination, by assessing the concentration of mercury in the sediments and in the whelk along the Portuguese coast. The concentration of total mercury in the sediments ranged from 0,02 up to 0,87  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (dwt) and was higher at sites located inside estuaries, whilst the organic mercury was below the detection limit and represented less than 1.5% of the total mercury. The concentration of total mercury in the gastropod varied between 0.06 e 0.83  $\mu\text{g g}^{-1}$  (dwt) in females and between 0.07 e 1.02  $\mu\text{g g}^{-1}$  (dwt) in males and were generally lower inside estuaries. The organic mercury in the whelk tissues ranged from 0.027 to 0.051  $\mu\text{g g}^{-1}$  (dwt), in females and from 0.025 to 0.75  $\mu\text{g g}^{-1}$  (dwt) in males. The total and organic mercury concentrations were similar for both genders at each sampling station.

The most relevant result obtained in this work is that mercury concentration in *Nassarius reticulatus* tissues is generally higher outside estuaries and both organic and inorganic mercury are negatively correlated with the total mercury concentration in the sediments. Besides, the organic mercury represents, in average, 59% of the total mercury in the tissues and this proportion is positively correlated with the total mercury body burden and is generally higher outside estuaries.

A laboratorial study was performed to assess if *Nassarius reticulatus* may accumulate inorganic mercury from the sediments, using experimental conditions similar to those found along the Portuguese coast in what regards to the sediment composition and mercury contamination levels. After 20 days of experiment there was no accumulation of mercury by *N. reticulatus* from contaminated sediments, comparing to the control.

The reasons for the negative correlation observed between the total mercury concentration in the sediments and in *Nassarius reticulatus* are discussed in the current work. It is possible that this pattern is partially due to a different contamination by organic mercury outside and inside estuaries related to distinct food items in the two types of habitat (estuarine and non-estuarine), as *Nassarius reticulatus* is a scavenger species and its diet

depends on dead animals that occur in both areas. However, this aspect does not fully explain the negative correlation observed between the mercury concentrations in the gastropod and in the sediments and more studies are needed to better explain this phenomenon.

We may conclude that *Nassarius reticulatus* is a poor indicator of the inorganic mercury contamination of the sediments. Nevertheless, this species may be useful to assess the presence of mercury in the ecosystems and to understand the possible paths of biomagnification of mercury in the food web, considering that this is a scavenger species.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>vi</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO	2
1.2 MERCÚRIO COMO POLUENTE EM SISTEMAS AQUÁTICOS	4
1.2.1 Principais Transformações do Mercúrio	4
1.2.2 Bioacumulação do Mercúrio	7
1.2.3 Toxicidade do Mercúrio	15
1.3 BIOINDICADORES	19
1.3.1 Utilização de Bioindicadores em Estudos de Contaminação Ambiental por Mercúrio	19
1.3.2 Biologia e Distribuição de <i>Nassarius reticulatus</i> (L.)	22
1.3.3 <i>Nassarius reticulatus</i> como Bioindicador de Contaminação Ambiental	24
1.4 OBJECTIVOS	25
<b>CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.1 LEVANTAMENTO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO DOS SEDIMENTOS E DOS TECIDOS DE <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> AO LONGO DA COSTA PORTUGUESA	27
2.1.1 Área de Estudo	27
2.1.2 Amostragem e Pré-tratamento	29
2.1.3 Determinação do Mercúrio Total	30
2.1.4 Determinação do Mercúrio Orgânico	31
2.1.5 Materiais de Referência	33
2.1.6 Limite de Detecção	34
2.2 ESTUDO LABORATORIAL DA ACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO POR <i>NASSARIUS RETICULATUS</i>	35
2.2.1 Desenho Experimental	35
2.2.2 Colheita e tratamento dos sedimentos	36

2.2.3 <i>Colheita e manuseamento dos animais</i>	37
2.2.4 <i>Determinação do Mercúrio Total nos Sedimentos e nos Tecidos</i>	38
2.2.5 <i>Determinação do Mercúrio Dissolvido Reactivo</i>	39
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>CAPÍTULO 3 – RESULTADOS</b>	<b>41</b>
3.1 LEVANTAMENTO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO DOS SEDIMENTOS E DOS TECIDOS DE <i>NASSARIUS RETICULATUS</i> AO LONGO DA COSTA PORTUGUESA	42
3.1.1 <i>Concentração de Mercúrio nos Sedimentos</i>	42
3.1.2 <i>Concentração de Mercúrio em Nassarius reticulatus</i>	44
3.2 ESTUDO LABORATORIAL DA ACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO POR <i>NASSARIUS</i> <i>RETICULATUS</i>	48
<b>CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b>	Principais transformações biogeoquímicas do mercúrio no ambiente (adaptado de Beckvar et al., 1996).	<b>6</b>
<b>FIGURA 1.2</b>	Concha de <i>Nassarius reticulatus</i> (extraída de Campbell e Nicholis, 1998).	<b>22</b>
<b>FIGURA 1.3</b>	Distribuição geográfica de <i>Nassarius reticulatus</i> (cor amarela) (adaptado de Macedo et al., 1999).	<b>23</b>
<b>FIGURA 2.1</b>	Mapa da costa Portuguesa com indicação das estações de amostragem (1 a 40) de <i>Nassarius reticulatus</i> e sedimentos.	<b>27</b>
<b>FIGURA 2.2</b>	Esquema do AMA-254 (Leco 254 Advanced Mercury Analyser) (adaptado de Costley et al., 2000)	<b>30</b>
<b>FIGURA 2.3</b>	Esquema do procedimento de extracção de mercúrio orgânico (adaptado de Válega et al., 2006).	<b>32</b>
<b>FIGURA 2.4</b>	Desenho experimental do trabalho de laboratório realizado.	<b>35</b>
<b>FIGURA 3.1</b>	Mapa das estações de amostragem e respectivas concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos sedimentos (A), nos tecidos das fêmeas (B) e dos machos (C) de <i>Nassarius reticulatus</i> e concentrações de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos tecidos das fêmeas (D) e dos machos (E) de <i>Nassarius reticulatus</i> . (As barras de erro representam o desvio padrão referente a três leituras da mesma amostra.).	<b>43</b>
<b>FIGURA 3.2</b>	<i>Nassarius reticulatus</i> . Relação entre a concentração de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos machos ( $\sigma$ ) e a concentração de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas ( $\rho$ ) (equação de regressão: $y = 0,97x$ ; $F = 377,0$ ; $P < 0,001$ ).	<b>44</b>
<b>FIGURA 3.3</b>	<i>Nassarius reticulatus</i> . Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas várias partes do corpo. Estações de amostragem (EA) 8, 9, 16 e 25. ■ tecidos, ■ opérculos, □ conchas.	<b>45</b>

- FIGURA 3.4** *Nassarius reticulatus*. Relação entre a concentração de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos machos ( $\sigma$ ) e a concentração de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas ( $\phi$ ) (equação de regressão:  $y = 0,88x$ ;  $F = 261,57$ ;  $P < 0,001$ ). **45**
- FIGURA 3.5** *Nassarius reticulatus*. Relação entre a proporção de mercúrio orgânico nos tecidos (relativamente ao mercúrio total) e a concentração de mercúrio total nos sedimentos. Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ). **46**
- FIGURA 3.6** *Nassarius reticulatus*. Logaritmo na base 10 das concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas ( $\phi$ ) e nos machos ( $\sigma$ ) em função das correspondentes concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos sedimentos. Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ). **47**
- FIGURA 3.7** *Nassarius reticulatus*. Logaritmo na base 10 das concentrações de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas ( $\phi$ ) e nos machos ( $\sigma$ ) em função das correspondentes concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos sedimentos. Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ). **47**
- FIGURA 3.8** *Nassarius reticulatus*. Logaritmo na base 10 das concentrações de mercúrio inorgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas ( $\phi$ ) e nos machos ( $\sigma$ ) em função das correspondentes concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos sedimentos. Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ). **47**
- FIGURA 3.9** *Nassarius reticulatus*. Relação entre  $RZ_{t/s}$  (razão entre a concentração de mercúrio total nos tecidos e nos sedimentos) e a concentração de mercúrio total nos sedimentos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (base log - log). Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ). **48**
- FIGURA 3.10** Concentrações de mercúrio dissolvido reactivo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na água para cada tipo de sedimento e tratamento. As barras de erro correspondem a 1 desvio padrão referente a duas leituras da mesma amostra. **49**
- FIGURA 3.11** Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (peso seco) medidas na fracção de partículas finas (A) e na fracção de areia (B), e estimada para a mistura das duas fracções (C), para os três tipos de sedimento em cada tratamento. As barras de erro correspondem a 1 desvio padrão referente a três leituras da mesma amostra. **50**
- FIGURA 3.12** *Nassarius reticulatus*. Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (peso seco) nos tecidos para cada tipo de sedimento e tratamento. As barras de erro

correspondem a 1 desvio padrão referente à quantificação de mercúrio em cinco animais diferentes da mesma situação experimental. **51**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b>	Concentrações de mercúrio total e de metilmercúrio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) no biota publicadas por vários autores.	<b>15</b>
<b>TABELA 1.2</b>	Exemplos de bioindicadores de poluição ambiental com mercúrio.	<b>21</b>
<b>TABELA 2.1</b>	Estações de amostragem e respectivas coordenadas geográficas ao longo da costa Portuguesa. As estações de amostragem indicadas a <i>itálico</i> localizam-se dentro dos estuários.	<b>28</b>
<b>TABELA 2.2</b>	Materiais de referência e respectivos valores certificados para o mercúrio e percentagem de recuperação.	<b>34</b>

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

## 1.1 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

A contaminação das águas costeiras por metais e organometais devido à actividade Humana tem sido uma ameaça para os ecossistemas marinhos e costeiros. A acumulação destes contaminantes nos organismos aquáticos determinará, em parte, a intensificação dos efeitos adversos no biota. A avaliação da qualidade ambiental é frequentemente feita em estuários e zonas costeiras por estes sofrerem um maior impacto de descargas antropogénicas.

A determinação do estado químico e ecológico das zonas costeiras exige estudos complexos e exaustivos em diferentes aspectos das interacções entre compartimentos e contaminantes, incluindo a sua especiação química. O uso de bioindicadores, no entanto, foi sugerido como metodologia (Sainz-Salinas *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 2004; Ugolini *et al.*, 2004; Roméo *et al.*, 2005) que pode fornecer dados de monitorização úteis, sem requerer um conjunto complexo de estudos. O conteúdo em metais vestigiais dos organismos foi extensamente usado em programas de biomonitorização de poluição com metais no ambiente marinho pois fornece informação sobre a biodisponibilidade do metal. Embora a maior parte das pesquisas nesta área tenham sido feitas em espécies do género *Mytilus* (Conti & Cecchetti, 2003; Liang *et al.*, 2004; Roméo *et al.*, 2005), é importante usar outros organismos, com largas distribuições geográficas e bioquímicas diferentes, para uma melhor avaliação da contaminação por metais do ambiente.

No caso do mercúrio, que é um poluente altamente nocivo com reconhecidos efeitos mutagénicos e teratogénicos, os dados sobre os mecanismos de tais efeitos são muito escassos e controversos na literatura (Cálderón *et al.*, 2003; Tchounwou *et al.*, 2003). Mesmo sabendo-se que os problemas devidos à contaminação por mercúrio são ampliados quando este entra na cadeia alimentar, poucos estudos existem focalizados especificamente para este campo.

Ao longo da costa Portuguesa foram identificadas algumas zonas com elevada contaminação por mercúrio, principalmente nos ecossistemas estuarinos tais como o Tejo (Canário *et al.*, 2003, 2005) e a Ria de Aveiro (Pereira *et al.*, 1998; Ramalhosa *et al.*,

2005a), enquanto que outros sistemas permanecem praticamente virgens no que diz respeito a este metal, nomeadamente o Douro (Ramalhosa *et al*, 2005b) ou o Mondego (Vale *et al.*, 2002). Contudo, há necessidade de conhecer melhor os níveis de contaminação por mercúrio ao longo de toda a linha de costa e, em particular, descrever os gradientes de contaminação entre o interior dos estuários e as zonas costeiras adjacentes. Por outro lado, é preciso avaliar, de forma cada vez mais abrangente, os seus efeitos nos organismos dos ecossistemas marinhos e estuarinos.

Tendo em conta a necessidade de melhor conhecer o nível de contaminação por mercúrio na costa Portuguesa e o actual interesse em explorar novos bioindicadores, pretende-se, neste trabalho, fazer o levantamento da contaminação por mercúrio nos sedimentos e em *Nassarius reticulatus* e avaliar a possível utilização desta espécie como bioindicadora da contaminação por mercúrio.

A escolha de *Nassarius reticulatus* para este estudo deve-se ao facto de ser um gastrópode prosobrânquio muito comum nas águas costeiras Portuguesas, sendo de fácil captura nas zonas intermareais. Por outro lado, esta espécie tem sido utilizada em Portugal como o principal bioindicador da poluição por tributilestanho (TBT) e seria útil aplicá-la na monitorização de outros tipos de poluição. A questão que se põe neste trabalho é se *N. reticulatus* será um bioindicador apropriado para monitorizar a contaminação por mercúrio. Também, o seu fácil manuseamento e manutenção em laboratório, fazem de *N. reticulatus* uma espécie com interesse para ser utilizada na realização de ensaios toxicológicos para este metal.

A presente dissertação encontra-se estruturada em cinco capítulos. Inicialmente (Capítulo 1), faz-se o enquadramento do tema de estudo e apresentam-se alguns conceitos teóricos considerados importantes para se compreender o trabalho realizado e melhor interpretar os seus resultados. No capítulo seguinte (Capítulo 2) é apresentada a metodologia do trabalho desenvolvido, o qual assenta em duas componentes principais: (i) rastreio da costa Portuguesa para determinação da concentração de mercúrio em sedimentos e em *Nassarius reticulatus* e (ii) ensaios laboratoriais para estudo da acumulação de mercúrio por esta espécie. No que se refere ao rastreio da costa Portuguesa, este capítulo caracteriza a área de

estudo e refere a estratégia de amostragem, os métodos de colheita e de tratamento prévio e análise das amostras e o controlo de qualidade efectuado às determinações de mercúrio. Relativamente aos ensaios laboratoriais, descreve-se o desenho experimental e referem-se os métodos de colheita, tratamento dos sedimentos, manuseamento dos animais e análise química das amostras. No Capítulo 3 apresentam-se os níveis de contaminação por mercúrio nos sedimentos e em *N. reticulatus* na costa Portuguesa, bem como os resultados obtidos sobre a acumulação de mercúrio por esta espécie sob condições controladas em laboratório. No Capítulo 4 discutem-se os resultados e referem-se as principais conclusões obtidas neste trabalho. Por último, no Capítulo 5, é descrita a bibliografia citada ao longo da dissertação.

## **1.2 MERCÚRIO COMO POLUENTE EM SISTEMAS AQUÁTICOS**

### **1.2.1 Principais Transformações do Mercúrio**

O mercúrio (Hg) é o metal pesado mais tóxico e tem um comportamento complexo no ambiente, podendo persistir durante décadas mesmo após a redução das descargas na fonte. A presença e a dispersão do mercúrio no ambiente provocam alterações nos ecossistemas, sendo por isso motivo de interesse científico e de preocupação, pois este elemento, além de ser tóxico para todos os organismos, é persistente e bioacumulável (Beckvar *et al.*, 1996; Pereira, 1996).

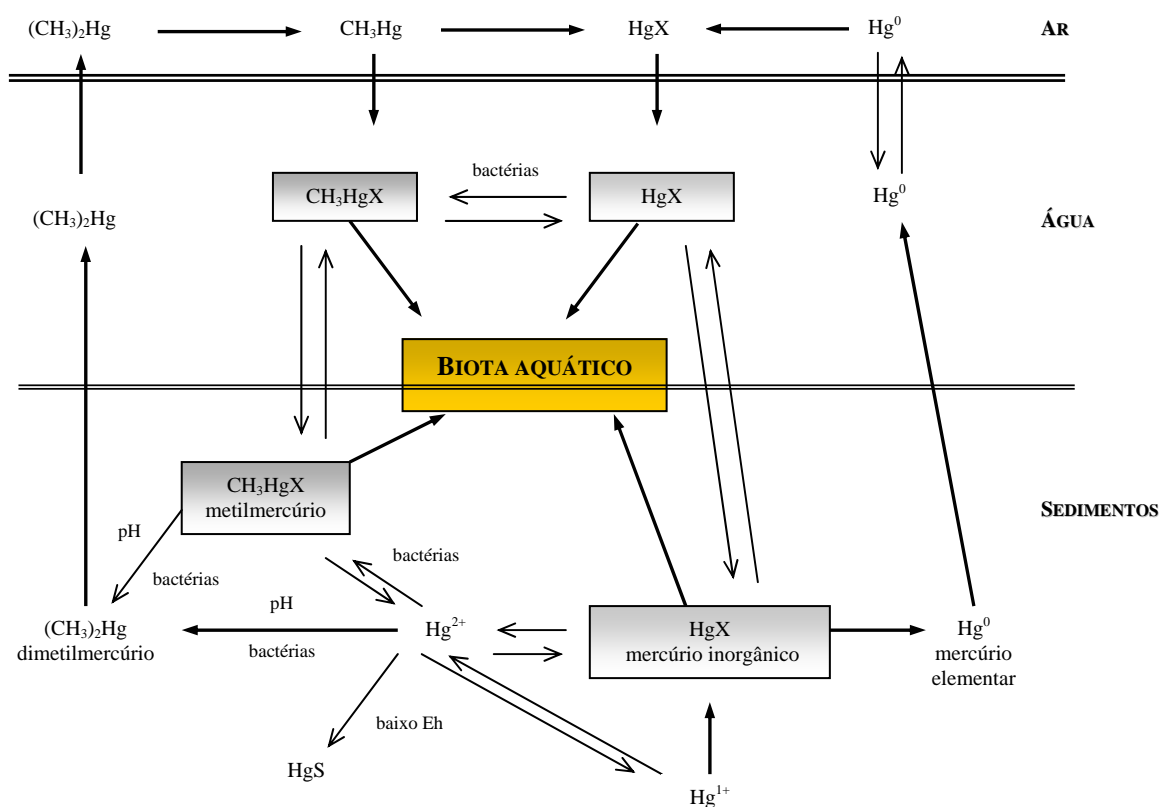
O mercúrio é o único metal líquido à temperatura ambiente, tem uma densidade de 13,5 g cm<sup>-3</sup>, uma temperatura de fusão de -38,89 °C, uma temperatura de ebulição de 357,25 °C e uma pressão de vapor elevada (0,16 Pa a 20 °C). As suas principais características são a baixa resistividade, a elevada condutividade térmica, a uniforme expansão de volume ao longo da gama líquida e a capacidade de dissolver um elevado número de metais formando amálgamas (Andren & Nriagu, 1979; Yu, 2001). O mercúrio tem tendência para formar ligações covalentes e não iónicas, ao contrário da maior parte dos metais (Andren & Nriagu, 1979).



A contaminação do ambiente por mercúrio é causada tanto por fontes naturais como por fontes antropogénicas. As fontes naturais incluem as emissões vulcânicas, a erosão dos solos naturalmente contaminados por mercúrio, as emissões gasosas da crosta terrestre e os processos de volatilização continental e oceânica. A maior parte do mercúrio provém de fontes antropogénicas, tais como a mineração, a queima de combustíveis fósseis, o processamento de pasta de papel, a incineração, o uso de compostos de mercúrio na agricultura, e as descargas das fundições de metais (WHO, 1976; Clark, 1992; Yu, 2001). O metal é também encontrado como sub-produto das indústrias de cloro e soda cáustica, em baterias usadas, em equipamentos eléctricos e em processos de recuperação de ouro (WHO, 1976; Clark, 1992; Yu, 2001).

O mercúrio pode existir em três estados de oxidação diferentes: o mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), o mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) e o mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). O mercúrio inorgânico inclui o mercúrio elementar e alguns complexos dos iões mercurioso e mercúrico. O  $\text{Hg}_2^{2+}$  forma unicamente compostos inorgânicos e, tal como o  $\text{Hg}^0$ , não pode ser metilado (Beckvar *et al.*, 1996). O  $\text{Hg}_2^{2+}$  resulta da reacção de dismutação do mercúrio elementar e do ião  $\text{Hg}^{2+}$  ( $\text{Hg}_2^{2+} \rightleftharpoons \text{Hg}^0 + \text{Hg}^{2+}$ ) e é a espécie menos comum no ambiente, uma vez que possui um intervalo de estabilidade muito restrito (Siegel & Siegel, 1979; Válega, 2002). O  $\text{Hg}^{2+}$  (mercúrio inorgânico divalente) é a principal forma nas águas naturais e tem uma forte afinidade para ligandos orgânicos e inorgânicos que contenham enxofre. Os compostos formados a partir do  $\text{Hg}^{2+}$  podem ser encontrados na forma de cloretos, nitratos e sulfatos (Beckvar *et al.*, 1996). A maior parte dos compostos de mercúrio inorgânico tem baixa solubilidade em água e elevada estabilidade química nos sedimentos (Pereira, 1996). Na Figura 1.1 estão representadas as principais transformações biogeoquímicas do mercúrio no ambiente (Beckvar *et al.*, 1996).

Assim, na água, nos sedimentos, no ar e nos solos (componente abiótica) predominam as espécies inorgânicas, e em organismos (componente biótica) a forma predominante é o metilmercúrio (Pereira, 1996; Válega, 2002). As principais transformações abióticas do metal envolvem a transalquilação e a actividade húmica, e as principais transformações bióticas são a metilação do mercúrio inorgânico, com a consequente formação de compostos orgânicos de mercúrio (Válega, 2002).



X =  $Cl_n$ ,  $(OH)_n$ ,  $(SH)$ , ácidos húmicos e fúlvicos, aminoácidos

**Figura 1.1.** Principais transformações biogeoquímicas do mercúrio no ambiente (adaptado de Beckvar *et al.*, 1996).

A dispersão do mercúrio no ambiente depende da forma química em que é libertado e das condições ambientais. As formas de mercúrio são afectadas pelas condições ambientais, tais como pH, potencial redox, teor de sulfuretos, concentração de cloretos, teor de matéria orgânica e actividade microbiana (Beckvar *et al.*, 1996). A conversão entre as diferentes formas químicas de mercúrio determina o seu complexo padrão de distribuição e de circulação biogeoquímica. O mercúrio elementar ( $Hg^0$ ), o mercúrio inorgânico divalente ( $Hg^{2+}$ ) e o metilmercúrio ( $CH_3Hg^+$ ) são as três formas de mercúrio mais importantes no ambiente aquático (Beckvar *et al.*, 1996; Ullrich, 2001). O mercúrio elementar é pouco solúvel na água, tem elevada pressão de vapor e é o principal componente do mercúrio gasoso na atmosfera. Embora a maior parte do mercúrio ocorra na forma inorgânica, o metilmercúrio é o mais tóxico e a forma de mercúrio mais facilmente bioacumulável. De facto, o metilmercúrio é bioacumulado pelos seres vivos e bioampliado ao longo da cadeia

trófica (Beckvar *et al.*, 1996; Callil & Junk, 2001; Ullrich, 2001), devido à sua persistência biológica e baixo teor de excreção (Mason *et al.*, 1995; Lawson & Mason, 1998). O processo de metilação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio é assim uma chave importante para o destino do mercúrio no ambiente (Beckvar *et al.*, 1996; Ullrich, 2001).

O mono- e o dimetilmercúrio são formados por microorganismos tanto nos sedimentos como na água através da metilação do ião mercúrico ( $Hg^{2+}$ ) (Mason *et al.*, 1995; Beckvar *et al.*, 1996; Ullrich, 2001), no entanto esta ocorre predominantemente nos sedimentos. O dimetilmercúrio, altamente volátil, não é geralmente persistente nos ambientes aquáticos (Beckvar *et al.*, 1996; Ullrich, 2001). A produção de metilmercúrio é função tanto da taxa de metilação como da taxa de desmetilação. Todavia, o metilmercúrio não se decompõe facilmente porque a taxa de metilação é mais elevada do que a taxa de desmetilação (Beckvar *et al.*, 1996).

As taxas de metilação e de desmetilação são influenciadas por variáveis ambientais que afectam tanto a disponibilidade do mercúrio para a metilação como o crescimento de populações microbianas metiladoras (Beckvar *et al.*, 1996; Ullrich, 2001). As taxas de metilação são elevadas em condições anóxicas e em ambientes com pH baixo. A presença de matéria orgânica pode estimular o crescimento de populações microbianas, aumentando deste modo a formação de metilmercúrio. O sulfureto pode ligar-se ao mercúrio limitando a metilação. A produção de metilmercúrio pode variar devido a alterações sazonais de nutrientes, oxigénio, temperatura e hidrodinâmica. Na maior parte dos estudos realizados verificou-se que a metilação aumenta durante os meses de Verão quando a produção biológica é maior, e diminui nos meses de Inverno (Beckvar *et al.*, 1996). Se as condições ambientais forem favoráveis à metilação, as concentrações de metilmercúrio podem ser elevadas relativamente à quantidade e distribuição do mercúrio total.

### **1.2.2 Bioacumulação do Mercúrio**

O mercúrio é o único metal que bioacumula através de todos os níveis da cadeia alimentar aquática (Lawson & Mason, 1998; Wang & Ke, 2002). Os organismos aquáticos podem acumular mercúrio a partir da água e a partir da comida (incluindo o sedimento). A

quantidade acumulada é função da via de exposição e de factores físicos e ambientais, tais como a temperatura, pH, salinidade, concentração de carbono orgânico total e sulfuretos. Se as condições forem favoráveis à metilação, os organismos podem acumular elevadas concentrações de mercúrio, mesmo com baixas concentrações na água e nos sedimentos (Beckvar *et al.*, 1996; Ullrich, 2001). A absorção e a depuração de mercúrio dependem da forma do mercúrio, da fonte de mercúrio (água ou comida) e do tipo de tecido receptor, resultando em padrões de acumulação diferentes (Wang & Fisher, 1999).

O mercúrio elementar é a forma mais volátil, e pode ser captada pelas vias respiratórias devido às suas características de alta difusividade e solubilidade em lípidos. Grande parte do vapor inalado permanece na corrente sanguínea e atravessa livremente as barreiras hematoencefálica e placentária. No entanto, o mercúrio elementar é transformado noutras formas de mercúrio o qual é rapidamente eliminado pelos rins, como mecanismo de defesa dos organismos (Mela, 2004). Para a maior parte dos organismos aquáticos o metilmercúrio é mais eficientemente acumulado do que o mercúrio inorgânico (Wang & Fisher, 1999), sendo a absorção do mercúrio inorgânico de cerca de 7% e a do metilmercúrio de 90 a 95% (Ritcher, 2001).

A maior parte do mercúrio é libertada para o ambiente como mercúrio inorgânico, que se liga primeiramente a partículas, e pode não estar disponível para a absorção directa pelos organismos aquáticos (Beckvar *et al.*, 1996). A forma inorgânica de mercúrio ocupa praticamente todos os sítios dos grupos sulfídricos das proteínas de membrana, ao contrário da forma orgânica que devido à sua lipossolubilidade ocupa sítios de ligação das proteínas localizados mais internamente na membrana, modificando a estrutura das proteínas e alterando de forma irreversível a função estrutural ou enzimática da molécula. Assim, o mercúrio inorgânico, menos lipossolúvel, concentra-se mais no plasma do que nos eritrócitos (Mela, 2004).

Tendo menor afinidade para as superfícies minerais do sedimento do que o ião  $Hg^{2+}$ , o metilmercúrio é libertado para a coluna de água e entra na cadeia alimentar (Mauro *et al.*, 1999). O metilmercúrio é transportado pelos eritrócitos (95%) e o restante encontra-se fortemente ligado a grupos sulfídricos das proteínas dos tecidos. A distribuição do Hg entre

os eritrócitos depende da forma do metal, sendo que a razão Hg-eritrócitos/Hg-plasma é de 1 para o mercúrio inorgânico e de 10 a 20 para o mercúrio orgânico (metilmercúrio) (Mela, 2004).

A água é uma via de exposição importante na absorção do mercúrio (tanto inorgânico como orgânico) para os organismos dos níveis mais baixos da cadeia trófica e consequentemente para toda a cadeia alimentar (Beckvar *et al.*, 1996). No fitoplâncton, nas algas e nos microorganismos, a absorção do mercúrio consiste num processo passivo que ocorre por adsorção à superfície das células através da interacção com grupos funcionais da parede celular (Windom & Kendall, 1979; Mason *et al.*, 1995; Beckvar *et al.*, 1996; Lawson & Mason, 1998). Pelo contrário, para os peixes e invertebrados a absorção do mercúrio consiste num processo activo que está relacionado com a taxa de respiração e com a taxa metabólica (Beckvar *et al.*, 1996).

Para os organismos aquáticos, os sedimentos são também uma via de exposição importante (Callil & Junk, 2001) para todas as formas de mercúrio. Os sedimentos são um compartimento do ecossistema onde os contaminantes podem ser retidos por largos períodos de tempo (Ramalhosa *et al.*, 2000; Ullrich *et al.*, 2001; Mountouris *et al.*, 2002; Vieira & Alho, 2004). O sedimento contaminado pode ser uma fonte dinâmica de mercúrio para a água e para o biota aquático durante 10 a 100 anos (Vieira & Alho, 2004). Avaliações experimentais demonstraram que a concentração de mercúrio acumulada em peixes e proveniente do sedimento chega a ser 9 vezes superior à proveniente da coluna de água (Vieira & Alho, 2004).

Para as espécies do topo da cadeia trófica pode ser difícil correlacionar as concentrações de mercúrio com as concentrações nos sedimentos. Assim, nas espécies do topo da cadeia trófica não são conhecidas correlações entre as concentrações de mercúrio nos tecidos e nos sedimentos. Esta dificuldade reflecte a complexidade de variáveis que afectam tanto a metilação do mercúrio na superfície do sedimento como a transferência de mercúrio entre os vários níveis tróficos (Beckvar *et al.*, 1996). Uma vez que a metilação ocorre primeiramente nos sedimentos, os factores físicos que afectam a taxa de metilação (e desmetilação) também afectam a disponibilidade do mercúrio para os organismos. As

concentrações do mercúrio total nos sedimentos por si só podem não fornecer informação suficiente sobre a exposição dos organismos (Beckvar *et al.*, 1996).

A grande diferenciação entre a acumulação do mercúrio inorgânico e do metilmercúrio ocorre durante a transferência trófica, devido às diferenças na assimilação das várias formas de mercúrio e à eficiência de transferência das mesmas para os predadores (Beckvar *et al.*, 1996). À medida que o metilmercúrio aumenta nas presas, a eficiência de transferência também aumenta. A exposição ao mercúrio pode ser alterada devido a mudanças na dieta durante a vida de uma espécie, a diferentes habitats ou até mesmo a diferentes estações do ano. As mudanças na dieta das presas de níveis tróficos similares mas de diferentes habitats, ou mudanças na dieta devido ao tamanho das presas podem também afectar as concentrações de mercúrio nos predadores de topo. Entre as presas e os predadores parece haver correlação nas concentrações de mercúrio (Beckvar *et al.*, 1996).

Os detritos também podem ser uma importante fonte de mercúrio, principalmente nos habitats estuarinos. Os detritos orgânicos de *Spartina alterniflora* podem conter cerca de 30 vezes mais mercúrio do que o plâncton. Assim, os organismos cuja alimentação se baseia em detritos estão mais expostos a elevadas concentrações de mercúrio do que animais que se alimentam de plâncton. O mercúrio que se encontra na matéria fecal dos mamíferos marinhos pode também ser uma fonte significativa para outros organismos aquáticos (Beckvar *et al.*, 1996).

Os principais factores biológicos que determinam a acumulação do mercúrio são a idade, o peso e a dieta (Wang & Ke, 2002). Diferenças na acumulação entre os sexos podem ser atribuídas a diferentes dietas (Beckvar *et al.*, 1996). Também, a temperatura e as estações do ano influenciam a disponibilidade e a acumulação de mercúrio. As mudanças de temperatura podem alterar as concentrações de mercúrio nos organismos tanto directamente, afectando a taxa metabólica e consequentemente a exposição, como indirectamente, influenciando a metilação do mercúrio e deste modo aumentando a disponibilidade. A relação do pH e da salinidade com a acumulação de mercúrio não está ainda bem compreendida (Beckvar *et al.*, 1996).

Tanto o fitoplâncton como o zooplâncton acumulam elevados níveis de mercúrio (Lawson & Mason, 1998), pois apresentam elevada sensibilidade para compostos de mercúrio devido ao elevado conteúdo em lípidos das suas membranas ou à inibição da síntese lipídica pelo metal (Windom & Kendall, 1979). Uma vez que o plâncton está na base da cadeia trófica no ecossistema aquático, a acumulação de mercúrio pode levar não só à quebra da cadeia alimentar, como também à bioacumulação do metal pelos organismos de níveis mais elevados da cadeia trófica (Yu, 2001). As concentrações de mercúrio no fitoplâncton das zonas costeiras reflectem geralmente as descargas de mercúrio locais (Windom & Kendall, 1979).

Normalmente os invertebrados apresentam quantidades de metilmercúrio mais baixas do que os peixes ou os mamíferos, e grandes variações de concentrações. Esta variação na concentração de mercúrio dos invertebrados deve-se às diferentes estratégias de alimentação (e diferentes níveis tróficos) e a exposições ambientais diferentes (Beckvar *et al.*, 1996). Assim, os invertebrados que se alimentam na coluna de água podem acumular maiores percentagens de mercúrio do que os invertebrados bênticos (Windom & Kendall, 1979). Por exemplo, a quantidade de metilmercúrio relativamente ao mercúrio total é de apenas 1% em poliquetas *Nereis succinea*; 10% em copépodes, mexilhões e camarões; 10-100% em berbigões; 16% em gónadas de ouriços-do-mar; 30-90% em zooplâncton; 87% em músculo de caranguejo; 100% em caranguejos de rochas vermelhas (Canadá) (Beckvar *et al.*, 1996). Em berbigão de um estuário poluído encontraram-se correlações lineares positivas entre a idade e a percentagem de mercúrio orgânico nos tecidos (Beckvar *et al.*, 1996). Esta relação foi atribuída à contínua absorção de mercúrio orgânico ao longo do tempo. No entanto, não foram encontradas correlações tão boas quando se utilizou o peso em vez da idade, o que é devido a variações na taxa de crescimento consoante os locais. Nos crustáceos podem ou não encontrar-se correlações com o peso e com a idade (Beckvar *et al.*, 1996). O tempo de vida médio para a eliminação de mercúrio total nos mexilhões varia de dois meses a um ano. Nos mexilhões e nos camarões o mercúrio inorgânico é eliminado mais rapidamente (Beckvar *et al.*, 1996).

Os gastrópodes marinhos pertencem ao segundo nível trófico do ecossistema marinho (Liang *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2004) e são conhecidos por acumularem elevadas

concentrações de metais nos tecidos (Hylland *et al.*, 1994; Callil & Junk, 2001; Wang & Ke, 2002; Conti & Cecchetti, 2003; Liang *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2004; Vieira & Alho, 2004; Storelli & Marcotrigiano, 2005), especialmente nas glândulas digestivas (Wang & Ke, 2002). No entanto, as vias e as taxas de acumulação de metais nestes animais ainda não são bem conhecidas (Wang & Ke, 2002). Nos gastrópodes marinhos, as concentrações de muitos metais, tais como Cd, As, Cr, Zn e Hg, podem ser mais elevadas do que as concentrações nos bivalves marinhos, uma vez que estes são frequentemente presas dos gastrópodes (Wang & Ke, 2002; Liang *et al.*, 2003). Os gastrópodes são uma importante fonte de alimento para os predadores de topo como peixes, aves aquáticas e caimões, que podem acumular mercúrio se os gastrópodes estiverem contaminados (Horne *et al.*, 1999; Callil & Junk, 2001).

Nos peixes, a acumulação do mercúrio a partir da água ocorre via guelras. Estas absorvem melhor o metilmercúrio do que o mercúrio inorgânico. O metilmercúrio é eventualmente transferido das guelras para o músculo ou outros tecidos, onde é retido por longos períodos de tempo. O mercúrio inorgânico é absorvido através da comida, sendo acumulado inicialmente nos tecidos do intestino do peixe, e não é facilmente transferido para outras partes do corpo. O fígado e o rim dos peixes têm normalmente maiores quantidades de mercúrio inorgânico do que o tecido do músculo, embora estas quantidades possam variar consoante o órgão e as espécies (Beckvar *et al.*, 1996). No entanto, o metilmercúrio que também é ingerido através da alimentação é eficientemente transferido do intestino para outros órgãos (Beckvar *et al.*, 1996). A razão fígado/músculo de concentração total de mercúrio normalmente tem flutuações à volta do valor 1 e reflecte a exposição do organismo. Por exemplo, a razão fígado/músculo pode ser menor que 1 quando há uma exposição crónica do peixe ao mercúrio, enquanto que uma exposição recente pode resultar numa razão maior do que 1 (Beckvar *et al.*, 1996). A acumulação do mercúrio faz parte de um processo dinâmico onde um organismo se esforça por manter o equilíbrio entre a absorção e a excreção (Yu, 2001). As taxas metabólicas dos peixes e a concentração de mercúrio parecem ser factores mais importantes na bioacumulação do que a idade ou a taxa de exposição (Yu, 2001). Tanto nos peixes como nos invertebrados a percentagem de metilmercúrio aumenta com a idade. Para algumas espécies (e.g. fitoplâncton, gastrópodes e peixes) as taxas de absorção de metilmercúrio e mercúrio inorgânico aumentam com o



aumento das concentrações aquosas e/ou com o aumento da temperatura da água. Uma subida da temperatura, e correspondente subida da actividade respiratória, pode aumentar a taxa de absorção via guelras (Beckvar *et al.*, 1996; Yu, 2001). Nalgumas espécies de peixes e invertebrados existem diferenças nas concentrações de mercúrio nos tecidos entre os sexos. Isto pode dever-se ao facto de as fêmeas se alimentarem mais na época de reprodução. Não foram encontradas correlações entre o conteúdo em lípidos e as concentrações de metilmercúrio nos peixes (Beckvar *et al.*, 1996). A principal via de depuração nos peixes é o rim e o fígado. O tempo de vida médio para a eliminação do metilmercúrio nos peixes é de 1 a 3 anos, enquanto que para a eliminação do mercúrio inorgânico é de 5 dias a 5 meses (Beckvar *et al.*, 1996).

De todos os organismos marinhos, os mamíferos são os que apresentam as concentrações de mercúrio nos tecidos mais elevadas. No entanto, as concentrações de mercúrio variam consoante a espécie e também dentro da mesma espécie. Estas variações são atribuídas aos diferentes habitats, às diferentes concentrações de mercúrio nas presas e à idade dos organismos (Beckvar *et al.*, 1996). Por exemplo, espécies como as morsas e as baleias azuis, que se alimentam de invertebrados bênticos, tendem a ter menores concentrações de mercúrio do que espécies que se alimentam de peixes, tais como toninhas e focas, que apresentam concentrações de mercúrio elevadas (Windom & Kendall, 1979; Beckvar *et al.*, 1996). Também se verificam correlações positivas entre as concentrações de mercúrio (tanto orgânico como inorgânico) e o comprimento dos animais. Ao contrário dos peixes, os mamíferos marinhos adultos apresentam percentagens de mercúrio inorgânico muito elevadas, embora as concentrações de metilmercúrio também possam ser significativas. Embora o mercúrio da dieta de muitas espécies de mamíferos marinhos seja essencialmente metilmercúrio, supõe-se que os mamíferos sejam capazes de mineralizar o metilmercúrio em formas inorgânicas menos perigosas (Beckvar *et al.*, 1996; Yu, 2001). As elevadas concentrações de mercúrio inorgânico verificadas nos mamíferos podem estar relacionadas com diferenças no sistema respiratório. Em contraste com os peixes, onde as guelras permitem trocas entre os contaminantes e o ambiente, pelo facto de o fluxo sanguíneo estar em contacto com a água, os mamíferos apresentam um sistema respiratório diferente, tendo por isso desenvolvidos mecanismos de defesa diferentes (Beckvar *et al.*, 1996). Os juvenis tendem a ter maiores percentagens de metilmercúrio. Normalmente, as

concentrações de mercúrio total e de metilmercúrio mais elevadas encontram-se no fígado, seguido do rim e dos tecidos do músculo. Contudo, a fração que é metilada no fígado é normalmente mais baixa do que a que é metilada no músculo e no rim (Beckvar *et al.*, 1996). O tempo de vida médio estimado para a eliminação de mercúrio total nos pinípedes e golfinhos é cerca de 1,4 e 2,7 anos, respectivamente (Beckvar *et al.*, 1996).

O mercúrio entra no Homem por duas vias, a respiratória e a alimentar, sendo esta última a mais importante, e é excretado pela via urinária (inorgânico) e pelas fezes (metilmercúrio e outros compostos orgânicos) (WHO, 1976; Pereira, 1996). O tempo de vida médio para a eliminação do mercúrio inorgânico do organismo humano é de 42 dias e para a eliminação do metilmercúrio é de 75 dias (Pereira, 1996). A contaminação dos organismos pode chegar ao Homem através da cadeia trófica normal.

Na Tabela 1.1 apresentam-se valores de concentração de mercúrio total e de metilmercúrio no biota publicados por vários autores. Pela análise da Tabela pode verificar-se que os valores de concentração mais baixos se encontram nos bivalves, seguidos dos gastrópodes, dos peixes e do Homem. Também, os peixes planctónicos apresentam valores mais baixos do que os carnívoros. Estes dados mostram a possível bioacumulação/bioampliação do mercúrio, pois as concentrações mais elevadas encontram-se nos níveis tróficos mais elevados.

**Tabela 1.1.** Concentrações de mercúrio total e de metilmercúrio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) no biota publicadas por vários autores.

Biota		Hg total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	MeHg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Local	Referência
Peixes	<i>M. liza</i> (peixe planctónico)	0,0154 ± 0,0058 a	0,0096 ± 0,0026 a	Baía Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil	Kehrig <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. furnieri</i> (peixe carnívoro)	0,1995 ± 0,1193 a	0,1947 ± 0,1127 a		
Bivalves	<i>Perna perna</i> (mexilhão)	0,0116 - 0,0535 a	0,0045 - 0,021 a	Mar do Bohai, China	Liang <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	0,0111 - 0,0382 a	0,0064 - 0,0244 a		
	<i>Meretrix meretrix</i>	0,0067 - 0,0921 a	0,0048 - 0,0475 a		
	<i>Sinonovacula constricta</i>	0,0098 - 0,0284 a	0,0073 - 0,0236 a		
	<i>Amusium</i> sp.	0,0134 - 0,0282 a	0,0097 - 0,0188 a		
	<i>Chlamys farreri</i>	0,0171 - 0,034 a	0,0116 - 0,0228 a		
	<i>Crassostrea talienwhanensis</i>	0,0156 - 0,0644 a	0,0082 - 0,037 a		
	<i>Mytilus edulis</i> (mexilhão)	0,011 - 0,1942 a	0,0089 - 0,0406 a		
	<i>Mya arenaria</i>	0,0161 - 0,0513 a	0,0116 - 0,0218 a		
	<i>Mactra veneriformis</i>	0,0078 - 0,0778 a	0,0056 - 0,0252 a		
	<i>Scapharca subcrenata</i>	0,0139 - 0,0993 a	0,0104 - 0,0384 a		
Gastrópodes	<i>Rapana venosa</i>	0,0113 - 0,453 a	0,0049 - 0,1684 a	Câmara de Lobos, Madeira, Portugal	Gaggi <i>et al.</i> , 1996
	<i>Neverita didyma</i>	0,0266 - 0,1387 a	0,0104 - 0,0499 a		
	<i>Neptunea arthritica</i>	0,0672 - 0,1095 a	0,0175 - 0,0276 a		
Homem		3,70 - 146	3,94 - 113		
		2,98 ± 0,02	1,77 ± 0,02	Taiwan, China	Chen <i>et al.</i> , 2002
		5,50 ± 0,06	3,95 ± 0,05		
		4,73 ± 0,04	1,77 ± 0,02		
	3,10 - 6,34	1,3	Kayapó-Goritire, Amazônia, Brasil	Gonçalves & Gonçalves, 2004	

a – peso húmido; ± – desvio padrão.

### 1.2.3 Toxicidade do Mercúrio

A toxicidade do mercúrio para os organismos aquáticos é afectada tanto por factores abióticos como bióticos, incluindo a forma de mercúrio (inorgânico versus orgânico), as condições ambientais (temperatura, salinidade e pH), a sensibilidade de cada espécie e estágios de vida, e a tolerância individual de cada organismo (Tchounwou *et al.*, 2003). Os efeitos toxicológicos incluem danos neurológicos, diminuição da reprodução, inibição do crescimento, desenvolvimento anormal e alterações de comportamento (Beckvar *et al.*, 1996). Os efeitos tóxicos do mercúrio também dependem da dose e da duração de exposição (Tchounwou *et al.*, 2003) e podem ser reversíveis ou irreversíveis (WHO, 1976). A exposição a vapor de mercúrio pode provocar alterações comportamentais reversíveis e a

exposição a compostos de metilmercúrio provoca danos neurológicos irreversíveis (WHO, 1976). Os efeitos neurotóxicos dos compostos de mercúrio estão relacionados com a sua solubilidade em lípidos. Os compostos de mercúrio reagem directa ou cataliticamente com os grupos de lípidos das estruturas das membranas das células do sistema nervoso central, promovendo hidrólises e decomposição hidrolítica (Armstrong, 1979). A exposição crónica a baixas concentrações de mercúrio pode tornar as populações tolerantes aos efeitos tóxicos de contaminação por mercúrio (Beckvar *et al.*, 1996).

A acção tóxica do mercúrio parece residir na forte afinidade do ião mercúrico para os componentes das células vivas. Este tem elevada afinidade para ligandos como fosfatos, cistidinas e histidinas das cadeias de proteínas, ou purinas e porfirinas, afecta a configuração dos ácidos nucleicos, inibe um grande número de enzimas bloqueando os grupos sulfídricos, pode alterar a actividade catalítica em certas enzimas e pode romper as vias de fosforilação oxidativa (Armstrong, 1979). A acumulação de metilmercúrio no cerebelo e no córtex cerebral, onde se liga firmemente a grupos sulfídricos (Ullrich, 2001), provoca danos no sistema nervoso central (Beckvar *et al.*, 1996).

A sensibilidade dos organismos aquáticos para o mercúrio inorgânico e para o metilmercúrio varia consideravelmente com as espécies (Beckvar *et al.*, 1996). Assim, baixas concentrações de mercúrio podem ser letais para algumas espécies de algas e diminuir o crescimento de outras. Os compostos organomercúricos retardam o crescimento e a viabilidade de muitas espécies de algas marinhas mais eficientemente do que o mercúrio inorgânico (Clark, 1992; Yu, 2001). Os embriões dos bivalves marinhos são mais sensíveis ao mercúrio do que as larvas, embora o crescimento das larvas também possa ser retardado com baixas concentrações de mercúrio, prolongando assim os estados pelágicos e aumentando o risco de predação, doença e dispersão (Beckvar *et al.*, 1996). À medida que a salinidade diminui, a toxicidade do mercúrio aumenta, o que afecta várias espécies estuarinas que migram para áreas dos estuários de baixa salinidade para se alimentarem e para fazerem a postura (Beckvar *et al.*, 1996). Assim, o impacto da toxicidade do mercúrio para uma dada população de invertebrados está altamente dependente do estágio de vida e das condições ambientais circundantes. Os primeiros estágios de vida dos invertebrados

marinhos são mais sensíveis à toxicidade dos metais (Bellas *et al.*, 2001; Beiras *et al.*, 2003).

Os peixes são mais sensíveis aos efeitos letais da exposição crónica ao mercúrio inorgânico e orgânico do que os invertebrados, mas são menos sensíveis aos efeitos agudos. Os primeiros estádios de vida dos peixes são geralmente os mais sensíveis ao mercúrio (Beckvar *et al.*, 1996). A sensibilidade do estágio embrio-larvar para várias espécies está relacionada com o tempo de desenvolvimento e incubação dos ovos e com a duração de exposição (Beckvar *et al.*, 1996). Experiências realizadas com juvenis de truta arco-íris e de salmão mostram que, a baixas concentrações, os primeiros efeitos nestes animais são um inchaço do opérculo e uma maior actividade respiratória, com o aumento das concentrações aparece a perda de equilíbrio, lentidão e a tendência a permanecer no fundo, e a exposição prolongada provoca a morte dos animais (Armstrong, 1979). Os peixes envenenados pelas descargas que continham metilmercúrio na Baía de Minamata apresentavam efeitos crónicos como emagrecimento, movimentos anormais, lesões cerebrais, cataratas e até era possível apanhá-los à mão (Armstrong, 1979). Organismos de ambientes contaminados por mercúrio e de ambientes limpos apresentam diferentes tolerâncias aos efeitos tóxicos do mercúrio (Beckvar *et al.*, 1996). Assim, os ovos de peixe colhidos em áreas contaminadas são muito mais resistentes aos efeitos teratogénicos do metilmercúrio. Os ovos dos peixes das áreas não contaminadas também acumulam maiores quantidades de mercúrio do que os ovos dos peixes das áreas contaminadas. Os juvenis dos peixes expostos à contaminação por mercúrio são também mais tolerantes às concentrações de mercúrio ambientais dos que os juvenis dos ambientes limpos (Beckvar *et al.*, 1996). O complexo comportamento do mercúrio no ambiente dificulta o prognóstico dos efeitos tóxicos baseado nas concentrações de mercúrio total nos sedimentos (Beckvar *et al.*, 1996). A toxicidade do mercúrio, e também de outros metais pesados, para os peixes aumenta com o aumento da temperatura (Yu, 2001).

É importante salientar que tanto a concentração nos tecidos, como o tempo e a via de exposição (i.e. água, comida, transmissão aos descendentes) são factores críticos nos sintomas tóxicos para os organismos aquáticos. O mercúrio transmitido das fêmeas para os ovos durante a oogénese pode ser um risco muito maior para o embrião do que a exposição

ao mercúrio na coluna de água (Beckvar *et al.*, 1996). As concentrações de mercúrio no tecido do cérebro, associadas a efeitos letais, parecem apresentar menos variação de indivíduo para indivíduo do que noutros tecidos, como o músculo e o resto do corpo. Este facto é consistente com a hipótese de que o sistema nervoso central, mais do que os tecidos do músculo ou outros órgãos, seja o local de maior acção tóxica nos peixes expostos ao mercúrio (Beckvar *et al.*, 1996).

A interacção do mercúrio com outros elementos vestigiais (cádmio, cobre, selénio e zinco) pode produzir efeitos sinérgicos ou antagónicos, dependendo das concentrações de exposição e da forma de mercúrio. O zinco e o cádmio reduzem os efeitos teratogénicos do metilmercúrio nalguns peixes. O cádmio adicionado ao metilmercúrio reduz o efeito retardador de regeneração das barbatanas das tainhas (Magos & Webb, 1979; Beckvar *et al.*, 1996).

Os dois maiores focos Japoneses de envenenamento por metilmercúrio que ocorreram na Baía de Minamata e em Niigata foram causados pela descarga industrial de metilmercúrio e outros compostos de mercúrio na Baía e no rio Agano, e resultaram na acumulação de metilmercúrio nos peixes e bivalves. No Iraque, entre 1971 e 1972, o envenenamento por metilmercúrio foi causado pelo consumo de pão, cujas sementes tinham sido tratadas com um fungicida que continha metilmercúrio. A concentração crítica de metilmercúrio nos órgãos difere para diferentes estágios do ciclo de vida humano. O cérebro de um feto em desenvolvimento pode ser o órgão mais sensível (órgão crítico), no que respeita a toxicidade do metilmercúrio no Homem (Yu, 2001). Em Minamata, mulheres que tinham consumido peixe da Baía deram à luz crianças com graves danos cerebrais. No entanto, elas apenas apresentavam sintomas como irritações e comichões, o que comprova que o cérebro do feto é muito mais sensível do que o cérebro adulto (Yu, 2001).

A toxicidade relativa dos vários compostos de mercúrio para os tecidos do Homem depende da relativa facilidade de formação do ião  $Hg^{2+}$ . Assim, o  $HgCl_2$  é muito tóxico, enquanto que alguns compostos organomercúricos não ionizáveis são relativamente seguros. Altas concentrações de compostos de mercúrio orgânico causam queimaduras na pele, enquanto que baixas concentrações podem causar dermatites (Yu, 2001). Os sintomas

clássicos de envenenamento por vapor de mercúrio são eretismo (irritabilidade, perda de memória e insónia), tremores e gengivites. A maior parte dos efeitos do vapor de mercúrio são reversíveis com a cessação da exposição, embora a completa recuperação dos efeitos psicológicos seja difícil de determinar (WHO, 1976). O metilmercúrio pode causar danos nos sistemas neurológico, excretor e reprodutor (Limbong *et al.*, 2005). Os sintomas e sinais clássicos mais comuns de envenenamento por metilmercúrio são paralisia, constrição do campo visual, diminuição da audição e ataxia. Estes efeitos são irreversíveis, no entanto podem ocorrer melhoramentos na coordenação motora (WHO, 1976). O envenenamento crónico por mercúrio pode resultar da exposição a pequenas quantidades de mercúrio por longos períodos de tempo, podendo ocorrer em indústrias que usem mercúrio ou os seus sais. Os sintomas incluem salivação, perda de apetite, anemia, gengivites, irritação excessiva dos tecidos, distúrbios nutricionais e danos renais. O envenenamento agudo por mercúrio resulta da ingestão de sais de mercúrio solúveis (Yu, 2001). Assim, a Organização Mundial de Saúde (WHO) estabeleceu como limite máximo de metilmercúrio em peixes para consumo  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (Pereira, 1996).

### **1.3 BIOINDICADORES**

#### **1.3.1 Utilização de Bioindicadores em Estudos de Contaminação Ambiental por Mercúrio**

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a importância de impactos ambientais num ecossistema.

Um organismo para ser considerado um bioindicador de referência deverá possuir as seguintes características (salienta-se que nenhum organismo possui todas estas características) (Pessoa, 1999): (i) ter capacidade de sobreviver aos níveis de contaminação que se pretendam monitorizar; (ii) dispor de tolerâncias ambientais específicas, de modo a apresentar uma resposta mensurável e definida face a pequenas mudanças da qualidade ambiental e que sejam facilmente distinguíveis das que ocorrem naturalmente; (iii) ter capacidade de acumular uma quantidade suficiente de poluentes para permitir uma

medição directa, sem necessidade de concentração prévia da amostra; (iv) existir uma correlação simples entre o teor/concentração do contaminante no organismo e a concentração do meio. Essa correlação deverá ser semelhante para todos os indivíduos da espécie, quaisquer que sejam o local, as condições bióticas e abióticas; (v) apresentar mobilidade limitada, para uma melhor análise espacial, tendo em conta que os organismos reflectem as condições ambientais do local em que permanecem durante todo o ciclo de vida de tal modo que seja representativo da área de estudo; (vi) ser facilmente amostrável e identificável taxonomicamente; (vii) ser abundante na área de estudo; (viii) estar bem estudado físió-ecologicamente; (ix) os efeitos não serem transmissíveis geneticamente às gerações futuras; (x) apresentar uma distribuição geográfica ampla; (xi) ter longevidade suficiente para permitir a amostragem por classe etária (se desejado); (xii) não ser patogénico para o Homem.

A biomonitorização permite estimar a biodisponibilidade dos contaminantes e os seus efeitos tóxicos sobre os organismos estudados (Callil & Junk, 2001). Uma importante presunção subjacente ao uso de bioindicadores é que a concentração de metal no bioindicador reflecte o nível de biodisponibilidade do metal no meio ambiente (Wang & Ke, 2002).

O uso de macrofauna bentónica na avaliação e monitorização de áreas contaminadas pode facilitar a determinação da distribuição espacial e temporal dos contaminantes, assim como a magnitude dos seus impactos (Horne *et al.*, 1999). Os moluscos gastrópodes são geralmente utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental devido à sua facilidade em acumular metais (Wang & Ke, 2002; Storelli & Marcotrigiano, 2005).

Assim, entre os organismos marinhos utilizados como bioindicadores em programas de monitorização de poluição ambiental com mercúrio salientam-se os moluscos gastrópodes (Horne *et al.*, 1999; Callil & Junk, 2001; Liang *et al.*, 2003; Vieira & Alho, 2004; Storelli & Marcotrigiano, 2005; Berto *et al.*, 2006), os peixes (Storelli & Marcotrigiano, 2005), os moluscos bivalves (Besada *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2002; Gregory *et al.*, 2002; Beiras *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003; Roméo *et al.*, 2005) e os crustáceos (Horne *et al.*, 1999;



Ugolini *et al.*, 2004). Na Tabela 1.2 mostram-se alguns exemplos de bioindicadores na monitorização de mercúrio.

**Tabela 1.2.** Exemplos de bioindicadores de poluição ambiental com mercúrio.

Biota		Metal	Local	Referência			
Moluscos Gastrópodes	<i>Littorina</i> sp.	Hg	Sapal, Sudeste Georgia	Horne <i>et al.</i> , 1999			
	<i>Pomacea lineata</i>	Hg	Pantanal da Região do Poconé, Mato Grosso, Brasil	Callil & Junk, 2001			
	<i>Pomacea scalaris</i>						
	<i>Marisa planogyra</i>						
	<i>Rapana venosa</i>	Hg	Mar do Bohai, China	Liang <i>et al.</i> , 2003			
	<i>Neverita didyma</i>						
	<i>Neptunea arthritica</i>						
	<i>Ampullaria scalaris</i>	Hg	Bacia do Rio Bento Gomes, Mato Grosso, Brasil	Vieira & Alho, 2004			
	<i>A. Canaliculata</i>						
	<i>Marisa planogira</i>						
	<i>Patella caerulea</i> (lapa)	Hg, Cd, Pb e Cr	Mar Jónico, Mar Mediterrâneo, Itália	Storelli & Marcotrigiano, 2005			
	<b><i>Nassarius reticulatus</i></b>	Hg	Lagoa de Venice, Itália	Berto <i>et al.</i> , 2006			
Peixes	<i>Mullus barbatus</i> (tainha)	Hg, Cd, Pb e Cr	Mar Jónico, Mar Mediterrâneo, Itália	Storelli & Marcotrigiano, 2005			
Moluscos Bivalves	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (mexilhão)	Cd, Cu, Hg, Pb e Zn	Costa Cantábrica e Costa da Galiza, Espanha	Besada <i>et al.</i> , 2002			
			Costa da Galiza, Espanha	Beiras <i>et al.</i> , 2003			
		Cd, Cu, Zn, Hg, Fe e Mn	Mar Negro, Roménia	Roméo <i>et al.</i> , 2005			
	<i>Mytilus</i> sp. (mexilhão)	Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Ni, Hg, As e Ag	Costa Basca, Norte de Espanha	Franco <i>et al.</i> , 2002			
	<i>Crassostrea angulata</i> (ostra)						
	<i>Perna perna</i> (mexilhão)	Hg	Praia de Isipingo, Sul de Durban, Sul de África	Gregory <i>et al.</i> , 2002			
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Hg	Mar do Bohai, China	Liang <i>et al.</i> , 2003			
	<i>Meretrix meretrix</i>						
	<i>Sinonovacula constricta</i>						
	<i>Amusium</i> sp.						
	<i>Chlamys farreri</i>						
	<i>Crassostrea talienwhanensis</i>						
	<i>Mytilus edulis</i> (mexilhão)						
	<i>Mya arenaria</i>						
	<i>Macra veneriformis</i>						
<i>Scapharca subcrenata</i>							
Crustáceos	<i>Uca</i> sp.				Hg	Sapal, Sudeste Georgia	Horne <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sesarma</i> sp.						
	Gammaridae						
	<i>Cyathura polita</i>						
	<i>Leptochelia</i> sp.						
	<i>Harpactocoid copodod</i>						
	Larva de caranguejo						
	<i>Talitrus saltator</i> (pulga do mar)	Al, Cd, Cr, Fe, Hg, Pb, Cu, Zn	Norte do Mar Mediterrâneo, Itália	Ugolini <i>et al.</i> , 2004			

### 1.3.2 Biologia e Distribuição de *Nassarius reticulatus* (L.)

*Nassarius reticulatus* é um molusco gastrópode prosobrânquio que tem uma concha sólida, espira alta, voltas arqueadas com cordões fortes longitudinais, ondulados, atravessados por estrias espirais. A concha, que pode atingir cerca de 35 mm de altura, apresenta uma columela calosa, abertura ovalar e tem cor amarelo-acastanhada (Macedo *et al.*, 1999) (Figura 1.2).



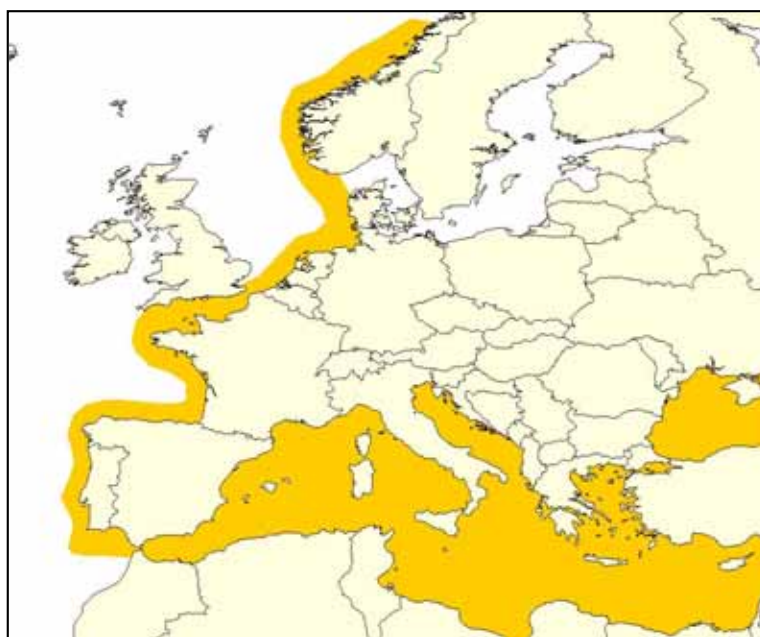
**Figura 1.2.** Concha de *Nassarius reticulatus* (extraída de Campbell e Nicholis, 1998)

O período de reprodução de *Nassarius reticulatus* varia com a sua distribuição geográfica, ocorrendo entre Fevereiro e Julho na Ria de Aveiro (Portugal), entre Março e Agosto em Plymouth (Inglaterra), entre Maio e Julho em Firth of Clyde (Escócia), entre Janeiro e Maio em Kiel (Alemanha) e entre Abril e Julho em Isefjord (Dinamarca) (Barnett *et al.*, 1980; Fretter & Graham, 1984; Barroso & Moreira, 1998). Ao longo da costa Portuguesa o ciclo reprodutor parece estar sincronizado (Barroso, 2001). Os ovos são depositados, dentro de cápsulas, em objectos fixos, nomeadamente em algas, rochas, pedras e conchas de moluscos sésseis (por exemplo, o mexilhão) (Barnett *et al.*, 1980; Fretter & Graham, 1984). Cada cápsula pode conter entre 50 a 350 ovos, os quais eclodem ao fim de 1-2 meses, dando origem a larvas velígeras com 250-350 µm de comprimento. O período larvar tem a duração aproximada de 2-3 meses e a pós-larva, após metamorfose, apresenta uma dimensão de cerca de 0,8 mm (Fretter & Graham, 1984).

Segundo Tallmark (1980), o crescimento de *Nassarius reticulatus* é muito rápido (5,5 mm/ano) nos primeiros 3 anos de vida e depois decresce notoriamente. O mesmo autor estimou uma idade máxima de 15 anos e determinou que a maturação sexual é atingida a partir do 4º ano de vida. Relativamente ao crescimento individual e à longevidade desta espécie na Ria de Aveiro, Barroso *et al.* (2005) verificaram que o crescimento ocorre nos primeiros 5 anos de vida, embora a longevidade da espécie tenha sido estimada em, pelo menos, 11 anos. A maturação sexual é atingida aos 3-4 anos de vida, no caso dos machos, e aos 4-5 anos, no caso das fêmeas.

A espécie é predominantemente necrófaga durante a fase de vida adulta, enquanto que os juvenis se alimentam sobretudo de detritos (Tallmark, 1980). Os principais predadores desta espécie são as estrelas-do-mar (Fretter & Graham, 1994).

*Nassarius reticulatus* apresenta uma ampla distribuição geográfica que se estende desde as Canárias e do Norte dos Açores até à Noruega e por todo o Mediterrâneo e o Mar Negro (Fretter & Graham, 1984). A distribuição geográfica desta espécie encontra-se representada na Figura 1.3 (Macedo *et al.*, 1999).



**Figura 1.3** Distribuição geográfica de *Nassarius reticulatus* (cor amarela) (adaptado de Macedo *et al.*, 1999).

*Nassarius reticulatus* ocorre desde o limite inferior do andar médiolitoral até cerca de 35 ou mais metros de profundidade, habitando, preferencialmente, os fundos de substrato móvel. A sua ocorrência em zonas intermareais é comum sobretudo em enclaves de praias rochosas com substrato móvel, onde se enterra superficialmente durante a baixa-mar (Barroso, 1995). Esta espécie é euri-térmica e euri-halina, sendo o seu limite inferior de tolerância em relação à salinidade de 16 (Eriksson & Tallmark, 1974 *in* Barnett *et al.*, 1980; Fretter & Graham, 1984).

### 1.3.3 *Nassarius reticulatus* como Bioindicador de Contaminação Ambiental

*Nassarius reticulatus* foi proposta pela primeira vez como espécie indicadora de poluição por tributilestanho (TBT) por Stroben *et al.* (1992) e desde então tem vindo a ser utilizada com êxito em programas de monitorização da poluição por TBT em França (Stroben *et al.*, 1992; Oehlmann *et al.*, 1993), no sul de Inglaterra (Bryan *et al.*, 1993), em Espanha (Barreiro *et al.*, 2001) e em Portugal (Pessoa, 1999; Barroso *et al.*, 2000, 2002b).

As tintas antivegetativas contendo tributilestanho (TBT) são utilizadas em navios desde 1960 (Bennet, 1996). Este composto é prejudicial a um grande número de organismos aquáticos, particularmente aos moluscos (Bryan & Gibbs, 1991). O imposexo – imposição de órgãos masculinos nas fêmeas (ex.: desenvolvimento de um pénis e de um vaso deferente) (Smith, 1971) – é um efeito causado pela poluição por tributilestanho. De facto, Smith (1981) verificou uma correlação positiva entre o grau de masculinização das fêmeas e a proximidade de marinas e portos navais. Este autor observou também, em experiências laboratoriais, que o desenvolvimento do pénis e do vaso deferente apenas se verificava em animais expostos ao TBT. O imposexo como resposta à contaminação por TBT é observado desde 1969 e afecta mais de 118 espécies de prosobrânquios em todo o mundo (Bettin *et al.*, 1996 *in* Barroso *et al.*, 2002a). Assim, a utilização de *Nassarius reticulatus* como indicador de poluição por TBT baseia-se na determinação do grau de desenvolvimento do imposexo nestes animais.

Uma vez que são realizados periodicamente programas nacionais de monitorização da poluição por TBT utilizando *Nassarius reticulatus* como principal espécie indicadora, seria conveniente utilizá-la também na monitorização de outros contaminantes, quer por razões de logística, quer pelo conhecimento que se possui sobre a biologia da espécie para a nossa costa.

## 1.4 OBJECTIVOS

O objectivo geral deste trabalho consiste no levantamento dos níveis de contaminação por mercúrio nos sedimentos e no molusco gastrópode *Nassarius reticulatus* ao longo da costa Portuguesa e estudar a possível utilização desta espécie como indicadora da contaminação por aquele metal. Pretende-se, também, analisar as possíveis vias de bioacumulação do mercúrio nesta espécie, com base em dados obtidos no campo e em ensaios laboratoriais. Para tal, foram definidos os seguintes objectivos específicos:

- (i) determinar a concentração de mercúrio, total e orgânico, nos sedimentos (fracção < 100 µm) ao longo da costa Portuguesa;
- (ii) determinar a concentração de mercúrio, total e orgânico, nos tecidos de *N. reticulatus* para os mesmos locais de amostragem dos sedimentos;
- (iii) verificar diferenças de contaminação por mercúrio entre machos e fêmeas desta espécie;
- (iv) comparar o nível de contaminação por mercúrio nos tecidos, opérculos e conchas de *N. reticulatus*;
- (v) estabelecer a possível relação entre a concentração de mercúrio nos tecidos de *N. reticulatus* e nos sedimentos;
- (vi) estudar a bioacumulação do mercúrio inorgânico por *N. reticulatus* a partir dos sedimentos em condições controladas;
- (vii) avaliar a utilidade deste molusco gastrópode como espécie indicadora da contaminação por mercúrio.

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1 LEVANTAMENTO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO DOS SEDIMENTOS E DOS TECIDOS DE *NASSARIUS RETICULATUS* AO LONGO DA COSTA PORTUGUESA

### 2.1.1 Área de Estudo

O levantamento da concentração do mercúrio nos sedimentos e em *Nassarius reticulatus* foi efectuado na costa oeste Portuguesa compreendida entre Vila Praia de Âncora (limite a norte) e a Praia da Luz (limite a sul). A estratégia de amostragem visou caracterizar possíveis gradientes de contaminação em torno dos principais estuários portugueses, incluindo-se estações de amostragem quer no interior de estuários, quer na zona costeira adjacente (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Mapa da costa Portuguesa com indicação das estações de amostragem (1 a 40) de *Nassarius reticulatus* e sedimentos.

Na Tabela 2.1 encontram-se os nomes e as respectivas coordenadas geográficas das estações de amostragem situadas ao longo da costa oeste Portuguesa.

**Tabela 2.1** Estações de amostragem e respectivas coordenadas geográficas ao longo da costa Portuguesa. As estações de amostragem indicadas a itálico localizam-se dentro dos estuários.

<b>Estações de Amostragem</b>	<b>Coordenadas Geográficas (EUR50)</b>
1. Vila Praia de Âncora	41° 48.93 N - 8° 51.94 W
2. Praia Norte	41° 41.85 N - 8° 51.13 W
<i>3. Viana do Castelo - Marégrafo</i>	<i>41° 41.43 N - 8° 49.71 W</i>
<i>4. Viana do Castelo - Estaleiro</i>	<i>41° 41.34 N - 8° 50.26 W</i>
<i>5. Viana do Castelo - Cais</i>	<i>41° 41.38 N - 8° 50.01 W</i>
<i>6. Viana do Castelo - Marina</i>	<i>41° 41.70 N - 8° 49.20 W</i>
<i>7. Viana do Castelo - Barra</i>	<i>41° 41.06 N - 8° 50.24 W</i>
8. Praia da Amorosa	41° 38.72 N - 8° 49.31 W
9. Póvoa de Varzim	41° 23.18 N - 8° 46.40 W
10. Praia de Leça	41° 12.21 N - 8° 42.82 W
<i>11. Porto de Leixões - Plat.2</i>	<i>41° 11.42 N - 8° 41.43 W</i>
<i>12. Porto de Leixões - Marina</i>	<i>41° 11.30 N - 8° 42.24 W</i>
<i>13. Porto de Leixões - Plat.1</i>	<i>41° 11.26 N - 8° 41.89 W</i>
<i>14. Porto de Leixões - Barra</i>	<i>41° 10.75 N - 8° 41.43 W</i>
15. Praia da Foz	41° 09.78 N - 8° 41.10 W
16. Espinho	41° 00.44 N - 8° 38.71 W
<i>17. Aveiro - S.Jacinto</i>	<i>40° 39.84 N - 8° 43.56 W</i>
<i>18. Aveiro - Porto Com. Norte</i>	<i>40° 39.06 N - 8° 43.76 W</i>
<i>19. Aveiro - Barra</i>	<i>40° 38.71 N - 8° 44.82 W</i>
<i>20. Aveiro - Magalhães Mira</i>	<i>40° 38.65 N - 8° 44.06 W</i>
<i>21. Figueira da Foz - Marina</i>	<i>40° 08.91 N - 8° 51.67 W</i>
<i>22. Figueira da Foz - Barra</i>	<i>40° 08.86 N - 8° 51.90 W</i>
<i>23. Figueira da Foz - Estaleiro</i>	<i>40° 08.60 N - 8° 51.55 W</i>
<i>24. Figueira da Foz - Porto de Pesca</i>	<i>40° 08.52 N - 8° 51.43 W</i>
<i>25. Figueira da Foz - Cais Comercial</i>	<i>40° 08.90 N - 8° 51.60 W</i>
<i>26. Nazaré - Porto de Pesca</i>	<i>39° 35.04 N - 9° 04.39 W</i>
<i>27. Peniche - Porto de Pesca</i>	<i>39° 21.15 N - 9° 22.52 W</i>
28. Praia do Guincho	38° 43.74 N - 9° 28.46 W
29. Praia das Avencas	38° 41.21 N - 9° 21.27 W
<i>30. Lisboa - Porto Brandão</i>	<i>38° 40.77 N - 9° 12.29 W</i>
<i>31. Lisboa - Trafaria</i>	<i>38° 40.55 N - 9° 14.09 W</i>
<i>32. Setúbal - Porto de Pesca</i>	<i>38° 31.17 N - 8° 52.58 W</i>
33. Portinho da Arrábida	38° 28.58 N - 8° 58.97 W
<i>34. Sesimbra - Porto de Pesca</i>	<i>38° 26.25 N - 9° 06.76 W</i>
<i>35. Setúbal - Tróia</i>	<i>38° 26.25 N - 9° 06.76 W</i>
<i>36. Sines - Porto de Pesca</i>	<i>37° 57.28 N - 8° 52.21 W</i>
37. Vila Nova de Mil Fontes	37° 43.30 N - 8° 47.25 W
38. Zambujeira do Mar	37° 33.20 N - 8° 47.44 W
39. Praia da Arrifana	37° 17.82 N - 8° 52.11 W
40. Praia da Luz	37° 05.21 N - 8° 43.64 W



### 2.1.2 Amostragem e Pré-tratamento

A amostragem de *Nassarius reticulatus* decorreu de Maio a Julho de 2000. As coordenadas geográficas dos locais de amostragem foram determinadas com um GPS (Tabela 2.1). Os espécimes foram colhidos à mão nas zonas intermareais e com nassas com isco nas zonas sub-litorais. Após a colheita, os animais foram mantidos num aquário durante 3 a 4 dias para eliminação de fezes, utilizando a mesma água do local de colheita.

Seleccionaram-se apenas animais adultos para análise, isto é, aqueles que apresentavam o calo columelar branco e dentes no lábio externo, sendo anestesiados numa solução de cloreto de magnésio a 7% durante cerca 40 minutos. No laboratório, mediu-se a altura da concha (distância entre o ápice da concha e o canal sifonal) com uma craveira, com uma precisão de 0,1 mm, as quais foram de seguida partidas num torno de bancada e eliminadas. Determinou-se o sexo dos animais com o auxílio de uma lupa, separando-se sub-amostras de machos e de fêmeas para as 40 estações de amostragem. Todas as amostras foram liofilizadas e de seguida homogeneizadas, por trituração em almofariz, sendo armazenadas em frascos de plástico e preservadas em local seco e fresco para posterior análise de mercúrio.

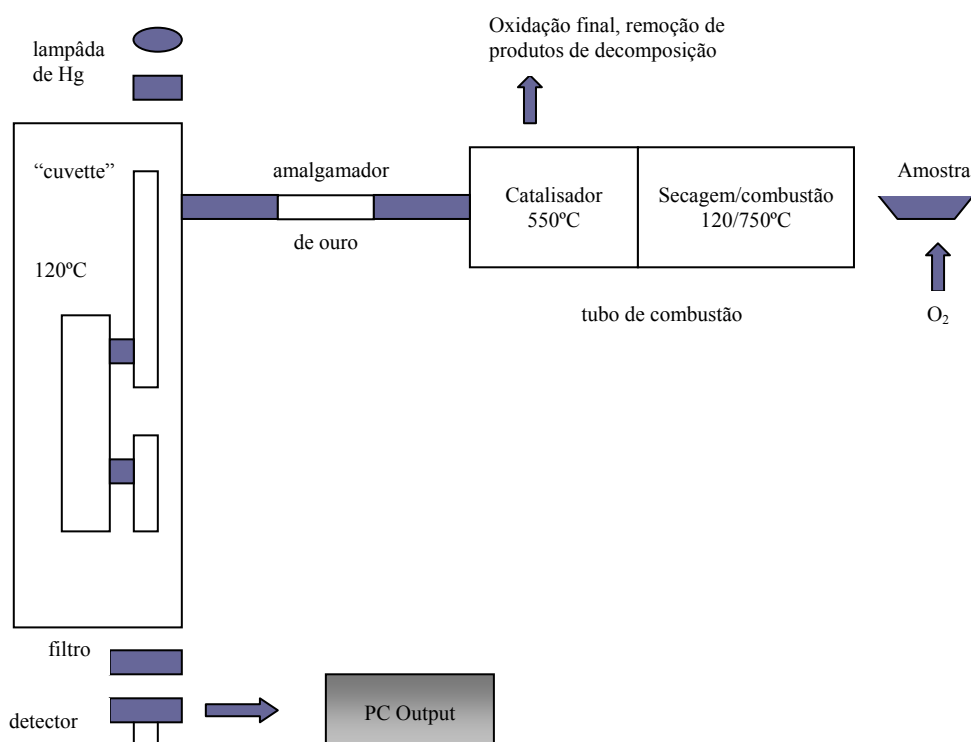
Nos locais de amostragem de *Nassarius reticulatus* colheram-se também amostras de sedimentos. Enquanto que nas zonas intermareais os sedimentos foram colhidos directamente da superfície, nas zonas sub-litorais estes foram obtidos com uma draga de van Veen. Em ambos os casos foi seleccionada apenas a camada superficial com 1-2 cm de espessura. As amostras foram colocadas em sacos de polietileno e armazenadas temporariamente em gelo. No laboratório, os sedimentos foram lavados num peneiro de malha de polipropileno de 100 µm, com água do local de onde tinham sido recolhidos. Depois de a água decantar, congelaram-se as amostras a -20 °C. Mais tarde, as amostras foram liofilizadas, homogeneizadas por trituração em almofariz, armazenadas em frascos de vidro e preservadas em local seco e fresco para posterior análise de mercúrio.

Alguns animais das estações de amostragem 8, 9, 16 e 25 foram congelados separadamente a -20 °C. Mais tarde, separaram-se 6 animais de cada uma destas estações. Retirou-se a concha e o opérculo de cada um deles e determinou-se o seu sexo. As conchas foram

separadamente homogêneas por trituração em almofariz, e assim como os opérculos, armazenadas em frascos de plástico e preservadas em local seco e fresco para posterior análise de mercúrio. Os respectivos animais foram liofilizados, homogêneos por trituração em almofariz, armazenados em frascos de plástico e preservados em local seco e fresco para posterior análise de mercúrio.

### 2.1.3 Determinação do Mercúrio Total

Para a determinação do mercúrio total ( $Hg_{total}$ ) nos sedimentos e nos tecidos, conchas e opérculos de *Nassarius reticulatus*, foi utilizado o método proposto por Costley *et al.* (2000), ou seja, a decomposição térmica com detecção por espectrometria de absorção atômica (AAS). O instrumento utilizado foi um AMA-254 (Leco 254 Advanced Mercury Analyser) cujo esquema se pode ver na Figura 2.2. (Costley *et al.*, 2000).



**Figura 2.2.** Esquema do AMA-254 (Leco 254 Advanced Mercury Analyser) (adaptado de Costley *et al.*, 2000).

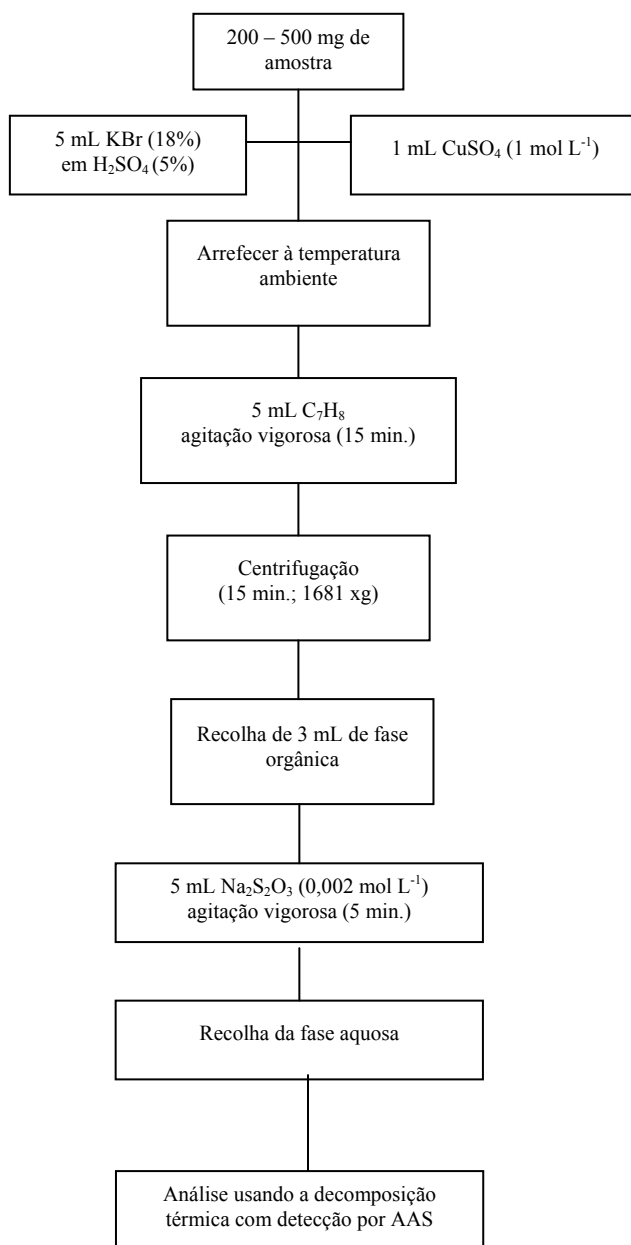
O sistema consiste numa barquinha de níquel que se insere num tubo de combustão de quartzo que contém um catalisador (oxalato de cobalto e uma mistura de óxido de manganésio, cobalto e acetato de cálcio) onde a amostra sólida (200-500 mg) é sujeita a uma secagem prévia, seguida de combustão a 750 °C numa atmosfera de oxigénio; o vapor de mercúrio libertado é retido num amalgamador de ouro. Depois de um intervalo de tempo pré-especificado (120-150 s), o amalgamador é aquecido a 900 °C de forma a libertar quantitativamente o mercúrio que, seguidamente, é transportado para uma “cuvette” aquecida (120 °C). Posteriormente o mercúrio é analisado por espectrometria de absorção atómica com um detector de silicone a 253,6 nm. As condições de operação típicas são: tempo de secagem, 30 s; tempo de decomposição, 150 s; tempo de espera, 40 s.

A principal vantagem deste método é o facto de não ser necessário fazer um pré-tratamento da amostra (Costley *et al.*, 2000), sendo apenas necessário liofilizar e homogeneizar a amostra sólida.

Assim, para as 40 estações e para as sub-amostras de machos, fêmeas e sedimentos, pesaram-se, numa balança analítica com uma precisão de 0,1 mg, cerca de 200 a 500 mg de amostra seca para análise de mercúrio. No caso das estações de amostragem 8, 9, 16 e 25 pesaram-se individualmente cada um dos animais, cada uma das conchas e os respectivos opérculos numa microbalança com uma precisão de 0,01 mg. Foram realizadas, pelo menos, três leituras de mercúrio por cada amostra de forma a garantir um coeficiente de variação menor que 10%; ao longo deste trabalho são expressos os valores médios da concentração de mercúrio para cada amostra ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) e o respectivo desvio padrão.

#### **2.1.4 Determinação do Mercúrio Orgânico**

Para a determinação do mercúrio orgânico ( $\text{Hg}_{\text{org}}$ ) nos tecidos de *Nassarius reticulatus* e nos sedimentos foi utilizado o método proposto por Válega *et al.* (2006). A Figura 2.3 mostra o esquema para o procedimento de extracção de compostos de mercúrio orgânico.



**Figura 2.3.** Esquema do procedimento de extracção de mercúrio orgânico (adaptado de Válega *et al.*, 2006).

Pesaram-se cerca de 200 a 500 mg de amostra seca. As amostras foram tratadas utilizando uma mistura de KBr 18% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%, seguidas de extracção em tolueno do mercúrio orgânico. As extracções foram sempre feitas em triplicado. A fracção aquosa, resultante da adição de solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, foi depois utilizada para análise de mercúrio, usando a decomposição térmica com detecção por espectrometria de absorção atómica (AAS).

Para a determinação do mercúrio inorgânico ( $Hg_{inorg}$ ) assumiu-se que este é equivalente à diferença entre o mercúrio total e o mercúrio orgânico.

### 2.1.5 Materiais de Referência

Um material de referência certificado (CRM) pode ser definido como um material com uma ou mais propriedades bem determinadas, medidas por procedimentos estabelecidos, e que vem acompanhado por um certificado cujas propriedades têm uma incerteza para um determinado nível de confiança. De forma a validar um método analítico e controlar a sua exactidão, o uso apropriado de materiais de referência certificados é crucial. Muitos materiais de referência certificados são avaliados por vários laboratórios (por exemplo, NBS, IAEA, BCR, NRC Canada, NIES e outras) para determinar o conteúdo em mercúrio (Morita *et al.*, 1998).

A exactidão e precisão do método analítico utilizado na determinação do mercúrio foram avaliadas utilizando materiais de referência consoante o tipo de amostra a analisar (Tabela 2.2). O material de referência utilizado foi o TORT-2 para os tecidos de *Nassarius reticulatus*, conchas e opérculos (amostras biológicas) e o MESS-2 e o CRM-580 para os sedimentos na determinação do mercúrio total e na determinação do mercúrio orgânico, respectivamente.

De forma a verificar se as concentrações diferem de forma significativa dos valores certificados, aplicou-se o teste *t* de *Student* ( $\alpha = 0,05$ ) para comparar o valor certificado com o valor obtido por análise do material de referência. Comparou-se a precisão das análises efectuadas nos materiais de referência com a dos ensaios de certificação aplicando o teste F às variâncias das determinações (Miller & Miller, 2000).

**Tabela 2.2.** Materiais de referência e respectivos valores certificados para o mercúrio e percentagem de recuperação.

	Material de Referência	Valor obtido*	n	Valor certificado*	Recuperação(%)
Mercúrio	TORT-2	$0,28 \pm 0,021 \mu\text{g g}^{-1}$	43	$0,27 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$	102,6
Total	MESS-2	$0,089 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$	21	$0,092 \pm 0,005 \mu\text{g g}^{-1}$	96,7
Mercúrio orgânico	TORT-2	$0,152 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$	27	$0,152 \pm 0,006 \mu\text{g g}^{-1}$	100,0
	CRM-580	$0,074 \pm 0,003 \mu\text{g g}^{-1}$	14	$0,076 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$	97,7

\* Valor médio  $\pm$  desvio padrão; n = número de análises.

Quando se aplicou o teste F às variâncias obtidas na análise dos materiais de referência e à do valor certificado dos mesmos, verificou-se, com um grau de confiança de 95%, que a precisão das análises efectuadas não diferia significativamente da precisão das análises dos ensaios de certificação. Verificou-se também que, relativamente às concentrações de mercúrio obtidas na análise dos materiais de referência, estas não diferiram significativamente do valor certificado (com um grau de confiança de 95%).

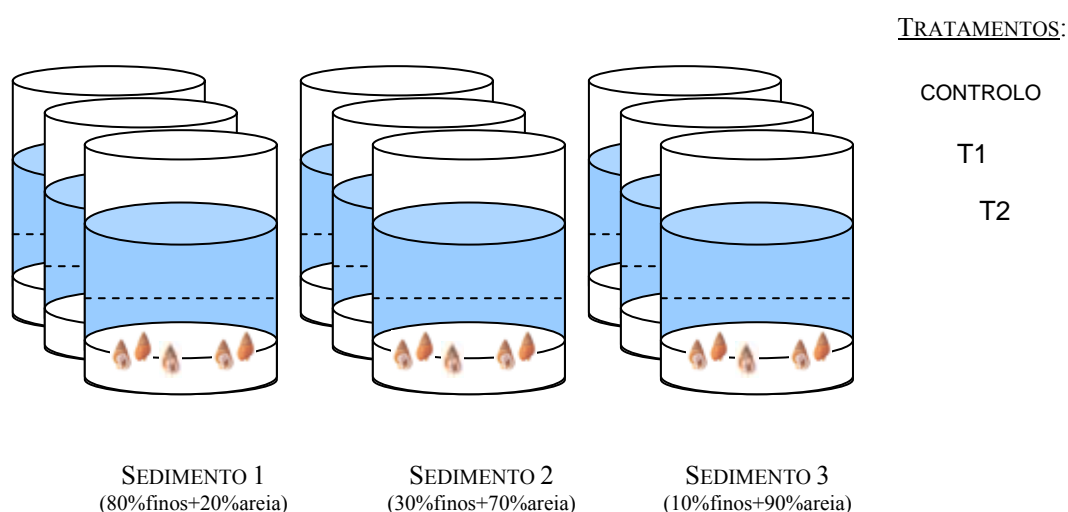
### 2.1.6 Limite de Detecção

O limite de detecção para a técnica de espectrofotometria de absorção atómica com decomposição térmica da amostra foi estimado de acordo com a média do sinal analítico dos brancos ( $n=16$ ) e o respectivo desvio padrão ( $lod = \text{média} + 3\text{stdev}$ ) (Miller & Miller, 2000). O limite de detecção foi estimado como sendo 0,03 ng de mercúrio.

## 2.2 ESTUDO LABORATORIAL DA ACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO POR *NASSARIUS RETICULATUS*

### 2.2.1 Desenho Experimental

O procedimento experimental utilizado é simples e pretendeu ser apenas uma abordagem preliminar para avaliar se pode ocorrer acumulação de mercúrio inorgânico por *Nassarius reticulatus* a partir dos sedimentos e da água. Simularam-se diferentes tipos de habitat que foram encontrados no rastreio ao longo da costa Portuguesa (ver ponto 2.1) no que diz respeito à composição dos sedimentos: sedimentos constituídos por 80% de partículas finas e 20% de areia, semelhantes às que podem existir no interior de estuários, e sedimentos com 30% ou 10% de partículas finas e a restante parte de areia, que se aproximam das condições que existem nas praias mais expostas. A cada um destes tipos de sedimentos adicionou-se mercúrio inorgânico de forma a obter três níveis de contaminação diferentes. Designamos neste trabalho por “Tratamentos” aos três diferentes níveis de contaminação obtidos; designa-se por “controlo” ao tratamento em que os sedimentos não receberam a adição de mercúrio; designa-se por “Tratamento 1” (“T1”) e “Tratamento 2” (“T2”) aos tratamentos em que se adicionou mercúrio aos sedimentos, sendo que T2 recebeu o dobro da quantidade de mercúrio de T1. As concentrações nominais de mercúrio pretendidas são um T1 com  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $0,5 \mu\text{g}$  de Hg por g de sedimento), um T2 com  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$  e um controlo livre de mercúrio. A montagem da experiência fez-se de acordo com a Figura 2.4.



**Figura 2.4.** Desenho experimental do trabalho de laboratório realizado.

Após o procedimento de contaminação dos sedimentos, colocaram-se 5 animais em cada frasco, e, logo de seguida, colocou-se uma rede 2 cm acima do sedimento, de modo a não deixar que os animais se afastassem do sedimento. Por fim, colocou-se arejamento. Este procedimento realizou-se com o máximo de cuidado para não ressuspender os sedimentos mais finos.

Monitorizou-se a experiência registando diariamente a salinidade dos controlos e a temperatura da sala. De forma a manter a salinidade de 35 constante, adicionou-se água destilada.

Após 10 dias de experiência, os animais foram transferidos para novos frascos com as mesmas condições e preparados segundo o mesmo procedimento de contaminação do sedimento. A experiência continuou a ser monitorizada e terminou ao fim de 20 dias.

### **2.2.2 Colheita e Tratamento dos Sedimentos**

De forma a obter fracções de sedimento com diferentes granulometrias, colheu-se uma elevada quantidade de sedimentos superficiais na margem poente do norte do Canal de Mira (Ria de Aveiro) (estação 20 – Tabela 2.1) e, após regresso ao laboratório, procedeu-se à sua secagem. Crivou-se o sedimento numa torre de crivos com abertura de malha de dimensões decrescentes (4 mm; 2 mm; 1 mm; 0,5 mm; 0,25 mm; 0,125 mm e 0,0625 mm) com agitação mecânica de forma a obter diferentes fracções granulométricas. As fracções escolhidas foram areia com granulometria entre 1 mm e 0,5 mm (neste trabalho designada por “fracção de areia” ou, simplesmente, “areia”) e partículas finas inferiores a 0,063 mm (aqui designada por “partículas finas” ou “finos”). Prepararam-se 3 misturas de sedimento com base no peso relativo de cada fracção; sedimento 1: 80% finos + 20% areia; sedimento 2: 30% finos + 70% areia e sedimento 3: 10% finos + 90% areia.

Procedeu-se à contaminação dos sedimentos de acordo com as seguintes etapas: (i) colocou-se água do mar a 35 de salinidade em todos os frascos, de forma a encharcar o sedimento; (ii) adicionou-se a cada frasco com sedimento uma alíquota de 500 µL de uma solução concentrada de mercúrio inorgânico (nitrato de mercúrio), tendo-se em seguida,



homogeneizado, com o auxílio de uma vareta de vidro, durante 5 minutos. Ao controlo foi adicionada a mesma quantidade (500 µL) de água destilada; (iii) adicionou-se, muito lentamente de forma a não ressuspender o sedimento colocado no fundo do frasco, cerca de 800 mL de água do mar a 35 de salinidade; (iv) deixou-se repousar cerca de 24 horas; (v) misturou-se novamente o sedimento e deixou-se repousar mais 24 horas; (vi) decantou-se, cuidadosamente para não retirar sedimento, o máximo possível de água; (vii) homogeneizou-se novamente o sedimento e deitaram-se os frascos, de modo a escorrer o total da água do mar que ainda poderia restar no interior dos mesmos. Os frascos tiveram um período de repouso de cerca de 24 horas; (viii) por fim, decantou-se a restante água e homogeneizaram-se cada um dos sedimentos durante 5 minutos, de forma a que as areias e os finos ficassem bem misturados. Em cada frasco voltou a adicionar-se, muito lentamente e com o auxílio de uma vareta de vidro de modo a não ressuspender os sedimentos, 900 mL de água do mar a 35 de salinidade. Deixou-se assentar durante 24 horas.

O processo de contaminação dos sedimentos acima descrito durou um total de 96 horas (4 dias). De seguida, antes de se colocarem os animais, foram recolhidas amostras de sedimento, as quais foram imediatamente congeladas a -20 °C. Mais tarde foram liofilizadas, crivadas com uma rede de 100 µm, de forma a obter as partículas finas, homogeneizadas por trituração em almofariz, armazenadas em frascos de vidro e preservadas em local seco e fresco para posterior análise de mercúrio. As areias obtidas da separação das fracções foram também armazenadas para posterior análise de mercúrio.

### **2.2.3 Colheita e Manuseamento dos Animais**

A colheita de *Nassarius reticulatus* realizou-se na Praia da Barra (junto à entrada da Barra da Ria de Aveiro) – estação 19 (Tabela 2.1) – com o auxílio de nassas com isco. Após regresso ao laboratório, o sexo dos animais foi determinado com uma lupa de dissecação, separando-se as fêmeas dos machos. Foram utilizadas apenas fêmeas na experiência.

Os animais aclimataram durante, aproximadamente, duas semanas em aquários em cascata com filtros naturais constituídos por 3 fracções diferentes de areias e cascalho intercalados com uma camada de lã de vidro.

Após os 20 dias da experiência, os 5 animais de cada sedimento e de cada tratamento foram congelados inteiros. Mais tarde, retirou-se a concha e o opérculo de cada um dos animais e os tecidos foram liofilizados, homogeneizados por trituração em almofariz, armazenados em frascos de vidro e preservados em local fresco e seco para posterior análise de mercúrio.

Foi também retirada uma amostra de água (50 mL) por cada frasco ao fim de 10 dias de experiência. As amostras de água foram acidificadas com 100 µL de HNO<sub>3</sub> (“mercury free”) e posteriormente foi analisado o mercúrio dissolvido.

#### **2.2.4 Determinação do Mercúrio Total nos Sedimentos e nos Tecidos**

Para a determinação do mercúrio total (Hg<sub>total</sub>) nos tecidos de *Nassarius reticulatus* e nos sedimentos, partículas finas e fracção de areia, foi utilizado o método proposto por Costley *et al.* (2000), isto é, a decomposição térmica com detecção por espectrometria de absorção atômica (AAS). O método encontra-se descrito no sub-capítulo 2.1.3.

Os animais foram pesados individualmente numa microbalança com uma precisão de 0,01 mg, assim como as amostras de sedimentos finos. As areias pesaram-se numa balança analítica com uma precisão de 0,1 mg. Foram realizadas, pelo menos, três leituras de mercúrio por cada amostra de forma a garantir um coeficiente de variação menor que 10%. Ao longo deste trabalho são expressos os valores médios da concentração de mercúrio para cada amostra (µg g<sup>-1</sup> peso seco) e o respectivo desvio padrão. No que diz respeito aos sedimentos foi analisada apenas uma amostra por cada situação experimental. Para *Nassarius reticulatus* foram analisados separadamente 5 animais por cada situação experimental.

Para os sedimentos e para os tecidos foram utilizados os mesmos materiais de referência descritos no sub-capítulo 2.1.5. O limite de detecção estimado encontra-se no sub-capítulo 2.1.6.

### 2.2.5 Determinação do Mercúrio Dissolvido Reactivo

A concentração de mercúrio dissolvido reactivo na água foi determinada pela técnica de espectrofotometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS) usando  $\text{SnCl}_2$  (10%, p/v) preparado em HCl a 5% (p/v) como agente redutor. O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro de fluorescência atômica PSA, modelo 10.003, equipado com um detector Merlin PSA, modelo 10.023. Foram realizadas duas leituras para cada amostra de água e por cada situação experimental.

Na quantificação do mercúrio na água foi utilizado o método da curva de calibração, obtida pela leitura de vários padrões de mercúrio, tendo sido estes preparados a partir de uma solução de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de mercúrio (BDH) em  $\text{HNO}_3$  (2% “Hg-free”, preparado em  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q). Foram usados padrões de mercúrio com várias concentrações, nomeadamente 0,05; 0,1; 0,3 e  $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ; a leitura do ácido nítrico 2% (Hg-free) foi considerada para a curva de calibração como sendo o padrão de  $0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de mercúrio. Durante a realização destas determinações foram sempre efectuadas curvas de calibração no próprio dia da análise, com pelo menos cinco padrões. Este método de trabalho foi adoptado dado que na análise de mercúrio por fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS), os valores obtidos para os intervalos de confiança (IC) do declive das várias curvas de calibração (Miller & Miller, 2000) realizadas em dias diferentes nem sempre se sobrepõem, tal como Pereira (1996) e Válega (2002) verificaram ocorrer em trabalhos anteriores.

No caso da técnica de espectrofotometria de fluorescência atômica o limite de detecção foi calculado a partir do método da curva de calibração visto não ser possível distinguir o sinal analítico do branco da flutuação da linha de base (Miller & Miller, 2000). O limite de detecção foi estimado como sendo  $0,026 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística de regressão, correlação (coeficiente de correlação de Pearson), teste F, teste *t*-Student e ANOVA realizada no presente trabalho foi executada com o programa STATISTICA 7.0.

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS**

### 3.1 LEVANTAMENTO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO DOS SEDIMENTOS E DOS TECIDOS DE *NASSARIUS RETICULATUS* AO LONGO DA COSTA PORTUGUESA

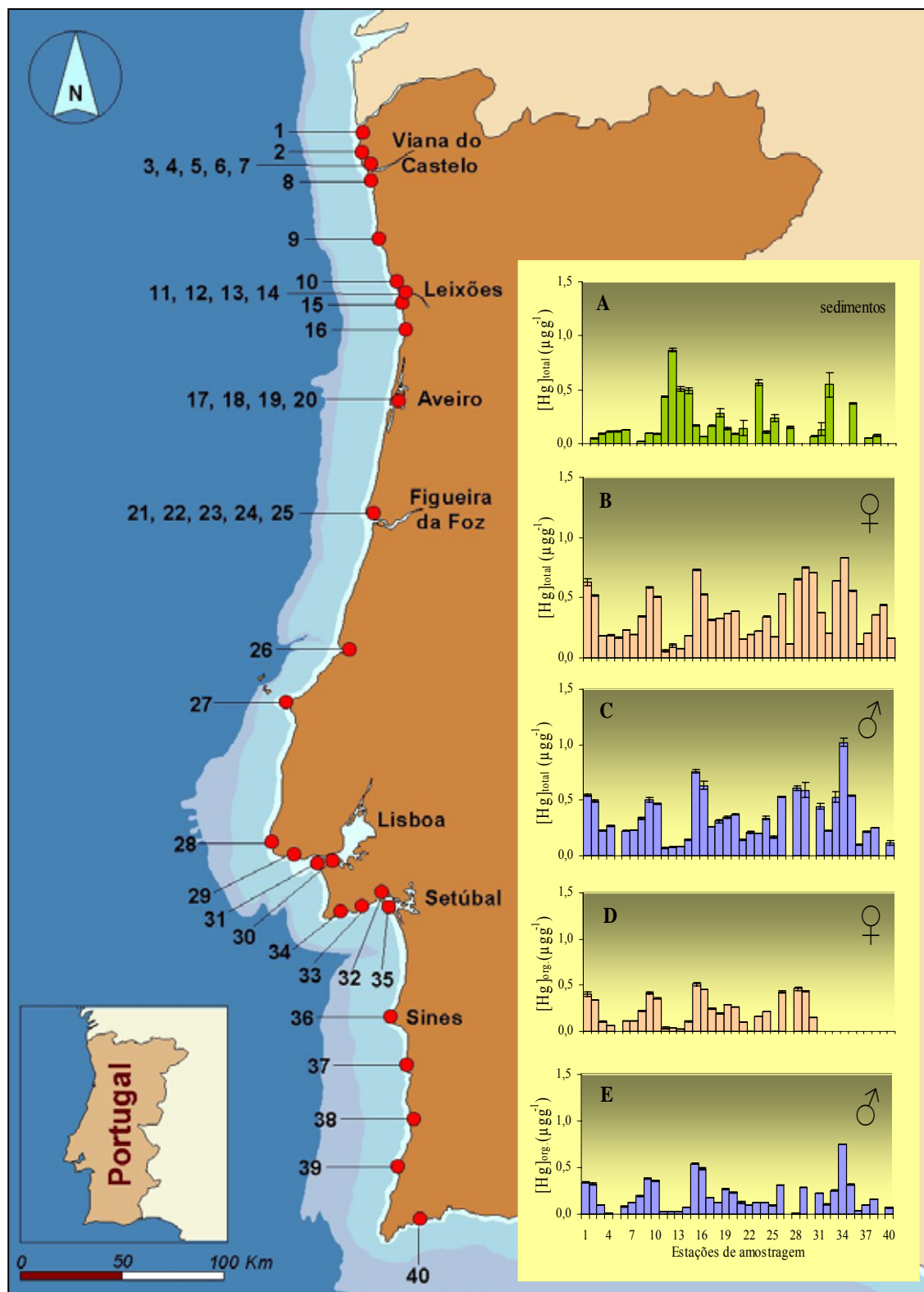
#### 3.1.1 Concentração de Mercúrio nos Sedimentos

A Figura 3.1 (A) mostra a localização das estações de amostragem ao longo da costa Portuguesa e os respectivos resultados obtidos para as concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos sedimentos.

As concentrações de mercúrio total nos sedimentos variaram entre 0,02 e 0,87  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco); as concentrações mais baixas foram observadas nas estações de amostragem localizadas em mar aberto (estações de amostragem 2, 8, 9, 10, 16, 30, 37 e 38), onde os valores não excederam 0,10  $\mu\text{g g}^{-1}$ , sendo a média dos valores das concentrações de mercúrio total de 0,07  $\mu\text{g g}^{-1}$ . As restantes estações de amostragem, localizadas dentro dos estuários, apresentaram, em geral, os valores de concentração de mercúrio total mais elevados, os quais variaram entre 0,09 e 0,87  $\mu\text{g g}^{-1}$  e a média foi de 0,28  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Nas estações de amostragem de Leixões observaram-se as concentrações de mercúrio total mais elevadas. Este sistema estuarino tem um importante porto comercial e recebe vários efluentes industriais, o que pode explicar estas elevadas concentrações. Nesta zona é possível descrever um incremento de mercúrio desde a zona costeira adjacente até ao interior do estuário (estações de amostragem 9 a 16).

Os valores de concentração de mercúrio orgânico nos sedimentos foram sempre abaixo do limite de detecção, representando menos de 1,5% da concentração de mercúrio total (calculado a partir do limite de detecção e dos valores de mercúrio total registados nos sedimentos).

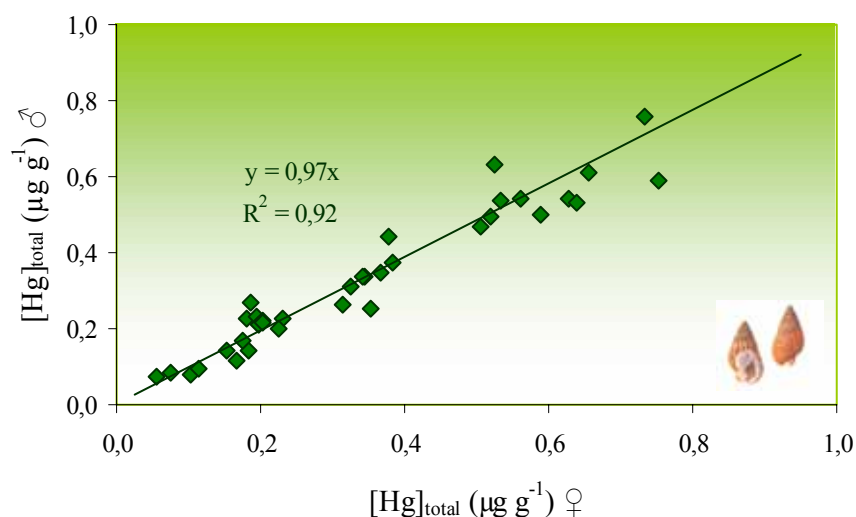


**Figura 3.1.** Mapa das estações de amostragem e respectivas concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos sedimentos (A), nos tecidos das fêmeas (B) e dos machos (C) de *Nassarius reticulatus* e concentrações de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos tecidos das fêmeas (D) e dos machos (E) de *Nassarius reticulatus*. (As barras de erro representam o desvio padrão referente a três leituras da mesma amostra).

### 3.1.2 Concentração de Mercúrio em *Nassarius reticulatus*

Ao longo da costa Portuguesa as concentrações de mercúrio total nos tecidos de *Nassarius reticulatus* variaram entre 0,06 e 0,83  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nas fêmeas (♀) (Figura 3.1 (B)) e entre 0,07 e 1,02  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nos machos (♂) (Figura 3.1 (C)). As concentrações de mercúrio total foram geralmente mais baixas no interior dos sistemas estuarinos (de 0,06 a 0,83  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) do que em mar aberto (de 0,11 a 1,02  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

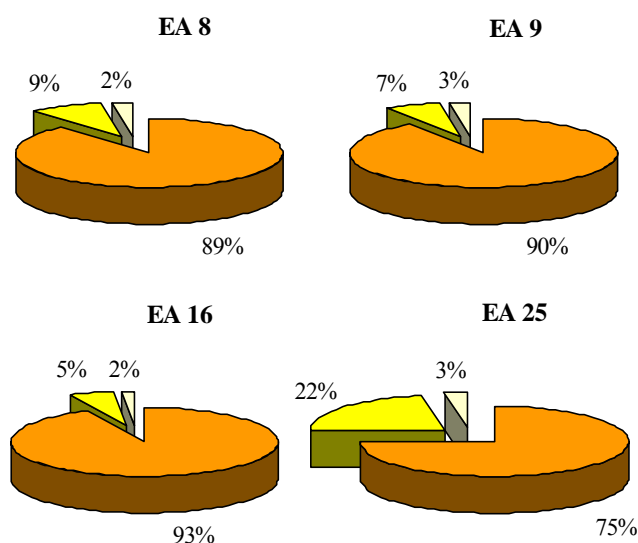
As concentrações de mercúrio total foram similares para os dois sexos (declive não estatisticamente diferente de 1;  $t = 0,6$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** *Nassarius reticulatus*. Relação entre a concentração de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos machos (♂) e a concentração de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas (♀) (equação de regressão:  $y = 0,97x$ ;  $F = 377,0$ ;  $P < 0,001$ ).

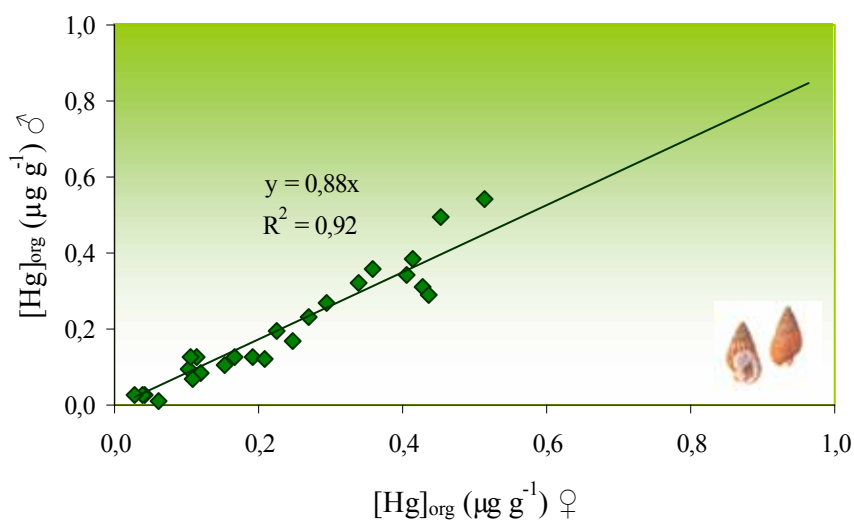
Para as estações de amostragem 8, 9, 16 e 25 determinaram-se as concentrações de mercúrio total nos tecidos, na concha e no opérculo de *Nassarius reticulatus*. Os resultados obtidos (em percentagem) encontram-se representados graficamente na Figura 3.3. Assim, verificou-se que 75 a 93 % do mercúrio total se encontra nos tecidos dos animais, 3 % na concha e 5 a 9 % no opérculo (com excepção da estação 25 onde a concentração de mercúrio total no opérculo ascende aos 22 %).





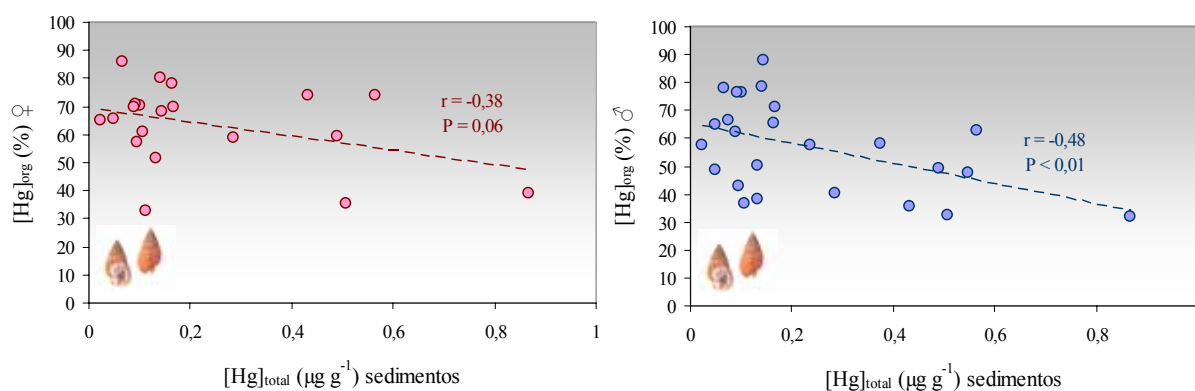
**Figura 3.3.** *Nassarius reticulatus*. Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas várias partes do corpo. Estações de amostragem (EA) 8, 9, 16 e 25.  
 ■ tecidos ■ opérculos □ conchas

Os valores de concentração de mercúrio orgânico variaram entre 0,027 e 0,51  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nas fêmeas (Figura 3.1 (D)) e entre 0,025 e 0,75  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) nos machos (Figura 3.1 (E)). Verificou-se que o mercúrio orgânico representa, em média, 59% do mercúrio total dos tecidos (variando entre 32,2% e 88,2%). Para ambos os sexos observou-se que os valores de concentração de mercúrio orgânico foram similares (declive não estatisticamente diferente de 1;  $t = 2,0$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** *Nassarius reticulatus*. Relação entre a concentração de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos machos (♂) e a concentração de mercúrio orgânico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nas fêmeas (♀) (equação de regressão:  $y = 0,88x$ ;  $F = 261,57$ ;  $P < 0,001$ ).

Verificou-se também que a proporção de mercúrio orgânico nos tecidos (relativamente ao mercúrio total) está inversamente correlacionada com a concentração de mercúrio total nos sedimentos ( $r = -0,484$ ;  $P < 0,01$ ) nos machos (Figura 3.5), embora para as fêmeas (Figura 3.5) não se tenha obtido uma correlação significativa ( $r = -0,38$ ;  $P = 0,06$ ). Por outro lado, a proporção de mercúrio orgânico nos tecidos está positivamente correlacionada com a concentração de mercúrio total nos tecidos nas fêmeas ( $r = 0,44$ ;  $P < 0,05$ ) e nos machos ( $r = 0,50$ ;  $P < 0,01$ ).

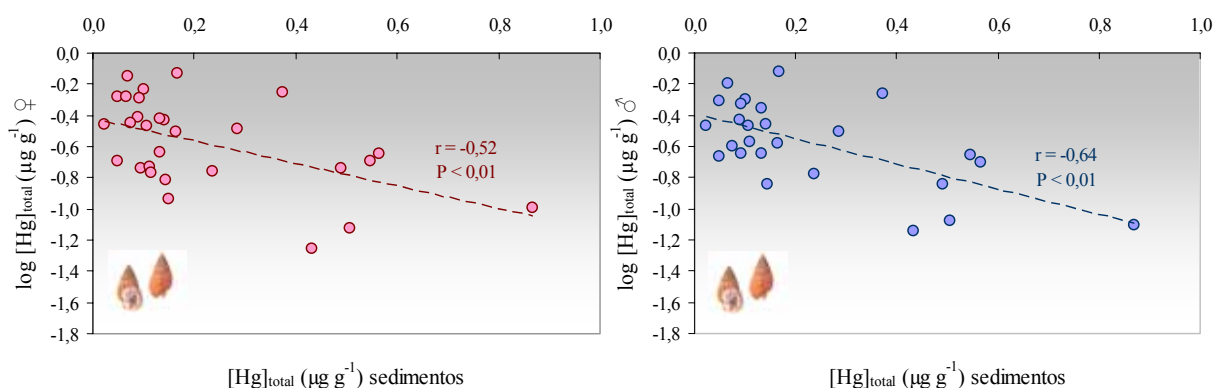


**Figura 3.5.** *Nassarius reticulatus*. Relação entre a proporção de mercúrio orgânico nos tecidos (relativamente ao mercúrio total) e a concentração de mercúrio total nos sedimentos. Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ).

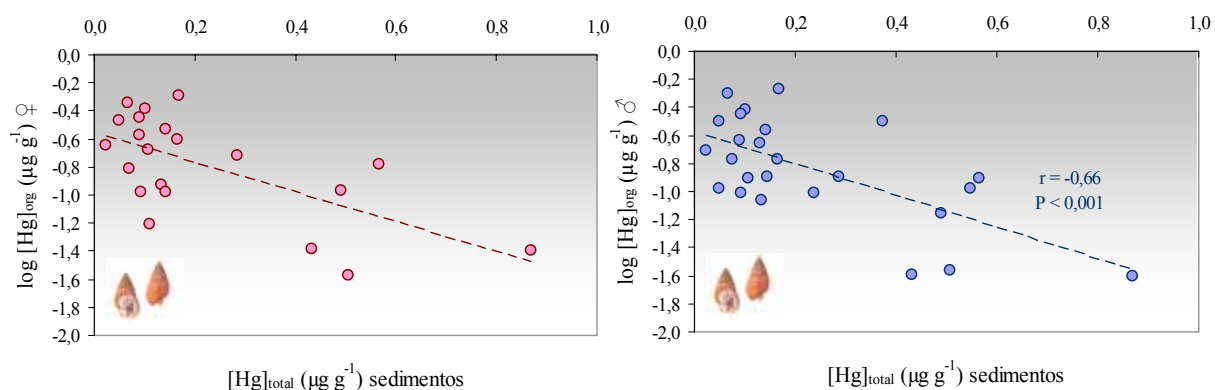
Efectuaram-se análises de correlação entre a concentração de mercúrio (total, orgânico e inorgânico) nos tecidos de *Nassarius reticulatus* e a concentração de mercúrio total nos sedimentos ao longo da costa Portuguesa (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8).

A análise de correlação entre as concentrações de mercúrio total nos sedimentos e o  $\log_{10}$  das concentrações de mercúrio total nos tecidos mostrou uma correlação inversa significativa, tanto para as fêmeas ( $r = -0,52$ ;  $P < 0,01$ ) como para os machos ( $r = -0,64$ ;  $P < 0,01$ ) (Figura 3.6).

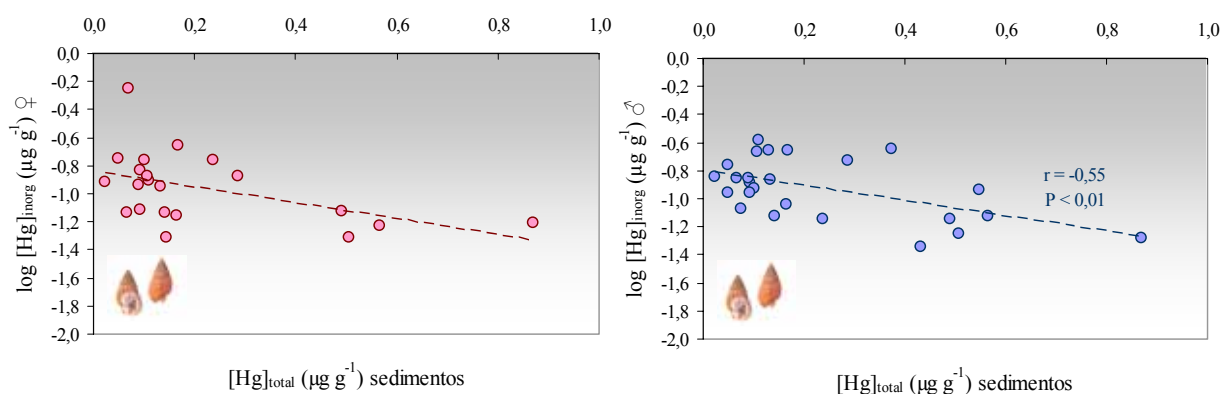
Também, a análise da correlação entre as concentrações de mercúrio total nos sedimentos e o  $\log_{10}$  das concentrações de mercúrio orgânico e inorgânico nos tecidos mostrou uma correlação inversa significativa, tanto para as fêmeas ( $r = -0,64$ ;  $P < 0,01$  (Figura 3.7);  $r = -0,48$ ;  $P < 0,01$  (Figura 3.8), respectivamente) como para os machos ( $r = -0,66$ ;  $P < 0,001$  (Figura 3.7);  $r = -0,55$ ;  $P < 0,01$  (Figura 3.8), respectivamente).



**Figura 3.6.** *Nassarius reticulatus*. Logaritmo na base 10 das concentrações de mercúrio total (µg g<sup>-1</sup>) nas fêmeas (♀) e nos machos (♂) em função das correspondentes concentrações de mercúrio total (µg g<sup>-1</sup>) nos sedimentos. Coeficiente de correlação (r) e significância (P).

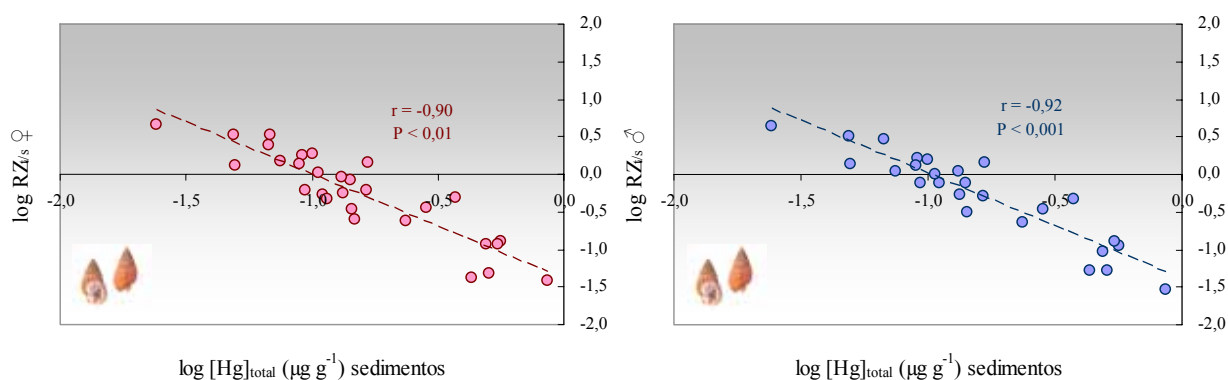


**Figura 3.7.** *Nassarius reticulatus*. Logaritmo na base 10 das concentrações de mercúrio orgânico (µg g<sup>-1</sup>) nas fêmeas (♀) e nos machos (♂) em função das correspondentes concentrações de mercúrio total (µg g<sup>-1</sup>) nos sedimentos. Coeficiente de correlação (r) e significância (P).



**Figura 3.8.** *Nassarius reticulatus*. Logaritmo na base 10 das concentrações de mercúrio inorgânico (µg g<sup>-1</sup>) nas fêmeas (♀) e nos machos (♂) em função das correspondentes concentrações de mercúrio total (µg g<sup>-1</sup>) nos sedimentos. Coeficiente de correlação (r) e significância (P).

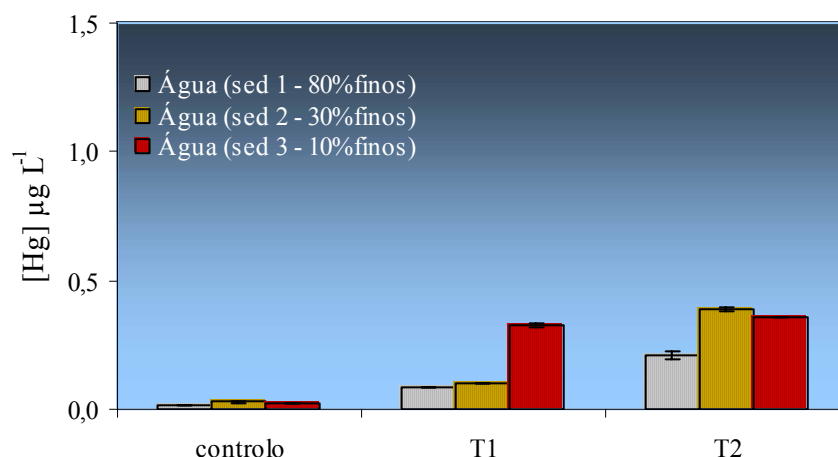
A razão entre a concentração de mercúrio total nos tecidos de *Nassarius reticulatus* e a concentração de mercúrio total nos sedimentos em cada estação de amostragem, aqui representada pelo símbolo  $RZ_{t/s}$ , variou entre 0,04 e 4,5 nas fêmeas e entre 0,03 e 4,4 nos machos. A análise de correlação entre o  $\log_{10}$  de  $RZ_{t/s}$  e o  $\log_{10}$  das concentrações de mercúrio total nos sedimentos mostrou uma correlação inversa, tanto para as fêmeas ( $r = -0,90$ ;  $P < 0,01$ ) como para os machos ( $r = -0,92$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** *Nassarius reticulatus*. Relação entre  $RZ_{t/s}$  (razão entre a concentração de mercúrio total nos tecidos e nos sedimentos) e a concentração de mercúrio total nos sedimentos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (base log - log). Coeficiente de correlação ( $r$ ) e significância ( $P$ ).

### 3.2 ESTUDO LABORATORIAL DA ACUMULAÇÃO DE MERCÚRIO POR *NASSARIUS RETICULATUS*

A Figura 3.10 mostra os resultados obtidos para as concentrações de mercúrio dissolvido reactivo nas águas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ao fim de 10 dias de experiência, em cada situação experimental. Comprova-se que nos tratamentos em que se adicionou mercúrio a concentração deste metal na água foi superior à da situação controlo. De facto, no controlo a concentração de mercúrio não ultrapassou os  $0,030 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que em T1 e em T2 a concentração de mercúrio variou de  $0,084$  a  $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$  e de  $0,21$  a  $0,39 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

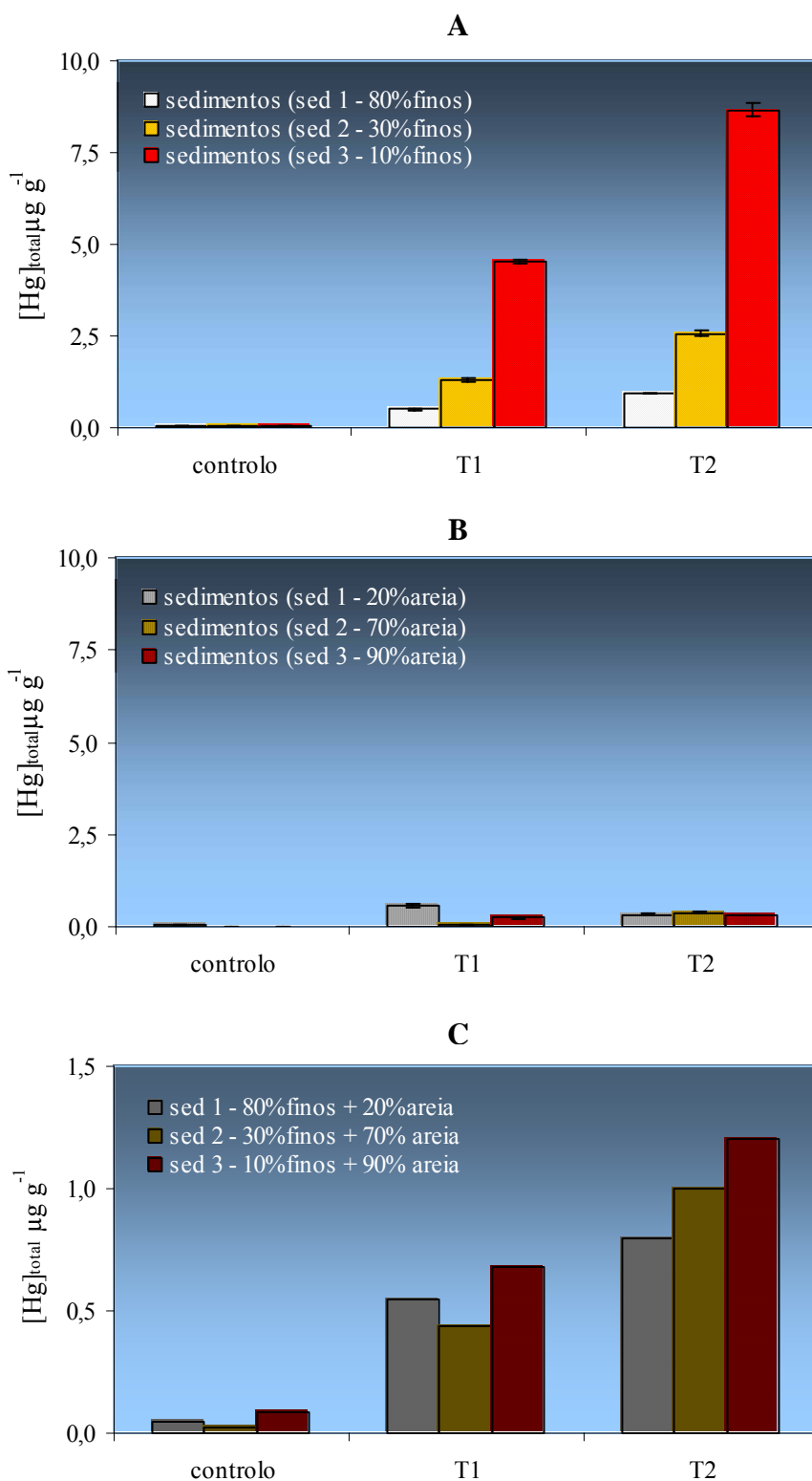


**Figura 3.10.** Concentrações de mercúrio dissolvido reactivo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na água para cada tipo de sedimento e tratamento. As barras de erro correspondem a 1 desvio padrão referente a duas leituras da mesma amostra.

Na Figura 3.11 estão representados os valores de concentração de mercúrio total nos sedimentos (finos, areias e mistura) para cada situação experimental no início da experiência.

A concentração de mercúrio na fracção de partículas finas dos sedimentos (Figura 3.11 (A)) variou entre 0,040 e 0,063  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) para a situação de controlo, entre 0,51 e 4,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) para T1 e entre 0,92 e 8,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) para T2. Constatase, assim, que a concentração de mercúrio na fracção de finos aumentou com a quantidade de mercúrio adicionada e esta concentração foi sempre superior nos sedimentos com menor porção de partículas finas.

Na fracção de areia (Figura 3.11 (B)) a concentração de mercúrio foi sempre inferior do que na fracção de finos, tendo variado entre 0,0036 e 0,076  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) no controlo, entre 0,073 e 0,56  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) em T1 e entre 0,32 e 0,38  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) em T2. Os resultados obtidos para a concentração de mercúrio na fracção de areia nos três tipos de sedimentos estão provavelmente afectados pelo facto de não estarem completamente limpos de partículas finas. Este facto pode conduzir a uma sobreavaliação da concentração de mercúrio na fracção de areias e, conseqüentemente, a uma estimativa menos rigorosa da concentração de mercúrio do sedimento total (mistura) (ver abaixo).

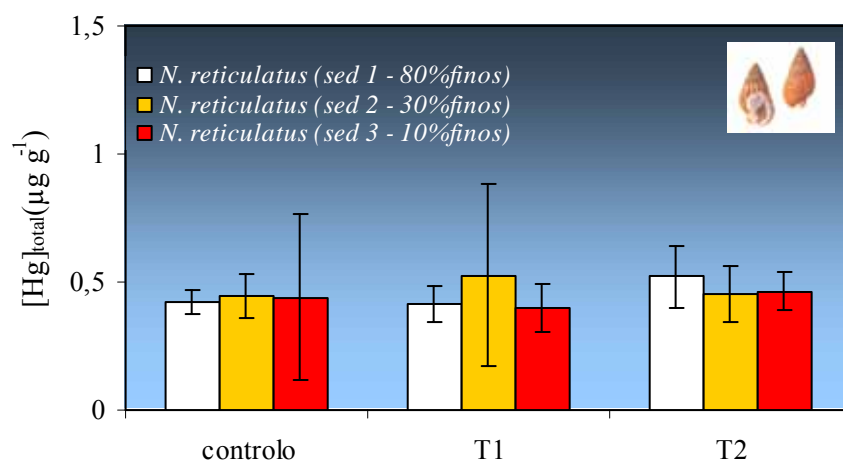


**Figura 3.11.** Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (peso seco) medidas na fracção de partículas finas (A) e na fracção de areia (B), e estimada para a mistura das duas fracções (C), para os três tipos de sedimento em cada tratamento. As barras de erro correspondem a 1 desvio padrão referente a três leituras da mesma amostra.

A Figura 3.11 (C) representa a contaminação de mercúrio para o sedimento total (mistura) estimada através da ponderação das concentrações de mercúrio determinadas para as frações de finos e areias que compõem o sedimento. A concentração de mercúrio total variou entre 0,024 e 0,086  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) no controlo, entre 0,44 e 0,68  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) em T1 e entre 0,80 e 1,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) em T2. A concentração de mercúrio nos sedimentos em T1 é cerca de metade da estimada para T2, o que é esperado visto que se adicionou o dobro da quantidade de mercúrio em T2 aquando do processo de contaminação dos sedimentos.

A água e os sedimentos do controlo não estão isentos de mercúrio, uma vez que os sedimentos provieram de um local relativamente pouco contaminado da Ria de Aveiro. No entanto, a concentração deste metal é muito baixa e serve os propósitos da experiência.

Os resultados obtidos para a concentração de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (peso seco) nos tecidos de *Nassarius reticulatus* apresentam-se na Figura 3.12.



**Figura 3.12.** *Nassarius reticulatus*. Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (peso seco) nos tecidos para cada tipo de sedimento e tratamento. As barras de erro correspondem a 1 desvio padrão referente à quantificação de mercúrio em cinco animais diferentes da mesma situação experimental.

A concentração de mercúrio nos tecidos de *Nassarius reticulatus* variou entre 0,40 e 0,52  $\mu\text{g g}^{-1}$  no conjunto dos tratamentos e nos três tipos de sedimento. Ao fim de 20 dias não se registaram diferenças significativas na concentração de mercúrio nos tecidos entre as diferentes situações experimentais; a análise de variância multifactorial (ANOVA; factor 1: tipo de sedimento, factor 2: tratamento) indica que a concentração de mercúrio nos tecidos não foi influenciada significativamente nem pelos diferentes tipos de sedimentos utilizados ( $F = 0,142$ ;  $P = 0,87$ ) nem pelos diferentes tratamentos ( $F = 0,210$ ;  $P = 0,81$ ). Verificou-se, portanto, que não houve acumulação de mercúrio por *N. reticulatus* durante o período de tempo da experiência.



# **CAPÍTULO 4**

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

O presente trabalho mostrou que, na costa Portuguesa, a concentração de mercúrio total na fracção < 100 µm dos sedimentos é mais elevada nos estuários, provavelmente devido à maior descarga de efluentes urbanos e industriais nestas áreas. O valor da concentração média de mercúrio total nos sedimentos dos estuários foi cerca de 4 vezes superior ao observado em praias expostas, onde as concentrações são similares às referidas para sedimentos não contaminados (Ullrich *et al.*, 2001). Uma vez que o mercúrio se liga preferencialmente à fracção de partículas finas (ver ponto 3.2), as quais são mais abundantes nos sedimentos estuarinos do que em praias expostas, as concentrações de mercúrio no sedimento total (não fraccionado) serão ainda potencialmente maiores nos estuários do que as referidas neste trabalho.

A concentração de mercúrio orgânico nos sedimentos situou-se sempre abaixo do limite de detecção, o que confirma a ideia generalizada de que as espécies inorgânicas são a forma de mercúrio predominante nos sedimentos (o mercúrio orgânico representa menos de 1,5% da concentração total). Nos sistemas de água doce, as concentrações de metilmercúrio nos sedimentos são normalmente 1 a 1,5% das concentrações de mercúrio total e tendem a ser mais baixas (0,5%) nos ambientes estuarinos e marinhos (Ullrich *et al.*, 2001).

Neste estudo, o aspecto de maior relevância foi o facto da concentração de mercúrio total nos tecidos de *Nassarius reticulatus* apresentar geralmente valores mais elevados fora dos estuários, e também o facto dos valores de concentração de mercúrio inorgânico e orgânico nos tecidos do animal serem inversamente correlacionados com a concentração de mercúrio total nos sedimentos. Entre as fêmeas e os machos não foram encontradas diferenças, o que pode sugerir que a absorção de mercúrio e a bioacumulação são independentes das respostas fisiológicas entre os sexos e da condição reprodutiva, e que a bioacumulação segue uma via similar independentemente do sexo. Verificou-se, também, que o mercúrio orgânico representa, em média, 59% do mercúrio total dos tecidos e que a percentagem de mercúrio orgânico nos tecidos (relativamente ao mercúrio total) está inversamente relacionada com a concentração de mercúrio total nos sedimentos.

Como *Nassarius reticulatus* é uma espécie bentónica e se enterra frequentemente nos sedimentos, poder-se-ia esperar que este comportamento favorecesse a acumulação de

mercúrio inorgânico por esta fonte e que esta acumulação fosse positivamente correlacionada com a concentração do mercúrio no sedimento. No entanto, não foi isto que se verificou no presente trabalho e podem sugerir-se algumas hipóteses para explicar este fenómeno. Uma diz respeito ao facto de se saber que o mercúrio inorgânico pode ser absorvido pelo biota a partir dos sedimentos, mas que também pode ser rapidamente depurado, o que leva a uma baixa acumulação a partir desta fonte (Beckvar *et al.*, 1996). Outra pode estar relacionada com uma eventual baixa biodisponibilidade de mercúrio para *N. reticulatus*, particularmente dentro dos estuários onde os sedimentos apresentam uma elevada proporção de partículas finas. Por outro lado, os sulfuretos presentes nos sedimentos em ambiente estuarino podem ligar fortemente o mercúrio (II) e podem tornar o mercúrio indisponível para o biota (Beckvar *et al.*, 1996).

Diversos autores obtiveram resultados divergentes relativamente à acumulação de mercúrio por diferentes espécies de gastrópodes. Horne *et al.* (1999) verificaram que as concentrações de mercúrio no gastrópode *Littorina sp.* aumentaram com o aumento das concentrações de mercúrio nos sedimentos. Callil & Junk (2001) demonstraram que os moluscos gastrópodes de zonas mais contaminadas apresentavam valores de mercúrio mais elevados, e que o gastrópode *Pomacea scalaris* pode ser considerado um bom indicador de mercúrio, uma vez que o conteúdo em mercúrio total dos seus tecidos é maior do que para outras espécies estudadas. Esta diferença na acumulação é devida ao comportamento específico de cada espécie, tal como a ocupação de nichos específicos de acordo com a disponibilidade alimentar (Callil & Junk, 2001). Liang *et al.* (2003) verificaram que os gastrópodes acumulam mais eficientemente mercúrio do que os bivalves e que com o aumento da dimensão da concha do gastrópode, aumenta o conteúdo em mercúrio. Os mesmos autores mostraram que o gastrópode *Rapana venosa* pode ser um potencial bioindicador para monitorizar a poluição por mercúrio em oceanos. Também Vieira & Alho (2004) encontraram uma forte correlação entre a concentração de mercúrio total nos gastrópodes *Ampullaria scalaris*, *A. canaliculata* e *Marisa planogira* e no sedimento e observaram níveis de mercúrio mais elevados nos gastrópodes do que nos sedimentos. Contudo, os resultados obtidos no estudo de Berto *et al.* (2006) sobre *Nassarius reticulatus* revelaram que não há correlação entre a concentração de mercúrio total nos sedimentos e a concentração de mercúrio total nos tecidos. Por outro lado, McGeer *et al.* (2003) fizeram

uma extensa revisão literária no que diz respeito à relação entre os factores de bioconcentração/bioacumulação e a concentração de exposição a metais nos organismos aquáticos, e constataram que existe uma tendência de redução da concentração de mercúrio nos tecidos dos moluscos, em vez de um aumento, à medida que aumenta a exposição ao mercúrio inorgânico. Segundo os mesmos autores, esta tendência contrasta com a acumulação de mercúrio noutras espécies, especialmente peixes e artrópodes, e mesmo em relação a outros metais, que é geralmente maior à medida que aumenta a exposição ao metal (McGeer *et al.*, 2003). Se isto se aplicar a *N. reticulatus*, pode também explicar a relação negativa encontrada entre o mercúrio nos tecidos e o mercúrio nos sedimentos ao longo da costa Portuguesa, embora este comportamento não se tenha verificado na experiência laboratorial realizada neste trabalho (ver abaixo).

Há poucas evidências de que os moluscos possam converter mercúrio inorgânico em orgânico (Fowler *et al.*, 1978), deste modo provavelmente o mercúrio orgânico determinado nos tecidos de *Nassarius reticulatus* é acumulado a partir de fontes externas. Segundo Wang & Ke (2002), a concentração de um metal nos gastrópodes pode não reflectir a concentração do metal no ambiente, mas sim a concentração do mesmo na sua dieta. A diferente contaminação nos tecidos de *N. reticulatus*, fora e dentro dos estuários, pode estar hipoteticamente relacionada com dietas distintas nos dois tipos de habitats (estuarinos e não estuarinos), uma vez que é uma espécie necrófaga e a composição da sua dieta depende dos animais que morrem nas diferentes comunidades. Esta hipótese é suportada pelo facto da percentagem de mercúrio orgânico nos tecidos de *N. reticulatus* tender a ser superior fora dos estuários (em média 66,5%) do que dentro dos estuários (em média 56,2%) e estar positivamente correlacionada com a concentração de mercúrio total nos tecidos. No entanto, as concentrações de mercúrio orgânico determinadas neste trabalho para este gastrópode são menores do que na maioria dos peixes adultos, onde o metilmercúrio geralmente representa mais do que 90% do mercúrio nos tecidos (EPA, 2001). Parks *et al.* (1989) mostraram que o metilmercúrio num sistema de água doce estava inversamente relacionado com as concentrações de mercúrio inorgânico nos sedimentos e que as concentrações de metilmercúrio na superfície da água e nos peixes eram maiores a cerca de 80 a 100 km a jusante da fonte, o que pode ser devido a uma diminuição na concentração de sulfuretos nos sedimentos, a jusante. Isto faz com que a concentração de

metilmercúrio seja inversamente correlacionada com o mercúrio inorgânico nos sedimentos, o que poderia hipoteticamente ocorrer também no presente estudo. Esta correlação negativa levanta implicações metodológicas importantes nos programas de monitorização, uma vez que a maior parte das monitorizações ambientais ocorrem nas proximidades das fontes de contaminação, quando, de facto, os locais com maior contaminação biótica podem surgir a centenas de quilómetros de distância, em áreas mais limpas, e implicar riscos no caso do consumo humano. Além disso, os efeitos adversos de episódios de descargas concentradas de mercúrio poderiam provavelmente emergir com atraso considerável nesses locais de contaminação distantes.

A correlação negativa entre a contaminação por mercúrio nos sedimentos e nos tecidos de *Nassarius reticulatus* observada ao longo da costa Portuguesa levanta uma série de aspectos que precisam de ser investigados, dos quais se destacam os mais importantes: (i) qual o factor de bioacumulação do mercúrio inorgânico e orgânico a partir dos sedimentos, da água e do alimento; (ii) qual a contribuição da alimentação na contaminação por mercúrio, considerando o efeito de bioampliação na cadeia trófica e o facto de *N. reticulatus* ser uma espécie necrófaga; (iii) qual a dieta desta espécie dentro e fora dos estuários; (iv) como varia a concentração do mercúrio em *N. reticulatus* com o tamanho e a idade dos animais. No que diz respeito aos pontos (ii) e (iii) a alimentação dos adultos é dirigida a cadáveres de animais invertebrados ou vertebrados recentemente mortos e a sua composição específica pode ser muito aleatória e diversificada, logo de difícil análise. O ponto (iv) é um aspecto que não terá influenciado os resultados obtidos no rastreio da costa Portuguesa porque os animais seleccionados para o estudo tinham um tamanho de concha semelhante e aproximadamente a mesma idade. Assim, de todos os aspectos referidos, o primeiro é o que merece maior relevância para este estudo, tendo sido investigado experimentalmente apenas na parte que diz respeito à bioacumulação de mercúrio inorgânico a partir dos sedimentos e da água.

Na experiência realizada neste trabalho (ver ponto 2.2), conseguiu-se simular condições próximas das encontradas na costa Portuguesa, não só no que respeita à composição granulométrica dos sedimentos dos diferentes habitats em que *Nassarius reticulatus* foi colhido, como também relativamente à contaminação por mercúrio. De facto, obtiveram-se

três níveis de contaminação distintos nos sedimentos, representando, aproximadamente, o nível mínimo, médio e máximo encontrados ao longo da costa.

Verificou-se que o mercúrio inorgânico se liga preferencialmente às partículas finas do sedimento em detrimento da areia. A interpretação destes resultados pode ser feita com base em duas hipóteses. Uma hipótese diz respeito apenas às propriedades físicas do sedimento, ou seja, as partículas finas (<0,063 mm) apresentam uma superfície por unidade de volume muito superior à das partículas de areia (0,5 mm - 1,0 mm), oferecendo uma área de adsorção maior. Outra hipótese referir-se-ia às propriedades químicas do sedimento, que não foram determinadas, em que o mercúrio pode ter uma maior afinidade química pelas partículas finas e matéria orgânica associada e por isso ligar-se selectivamente a estas.

No que diz respeito à água, confirmou-se que a concentração de mercúrio reactivo foi baixa no controlo e proporcionalmente mais elevada nos tratamentos que receberam maior quantidade de mercúrio.

Na experiência desenvolvida, os animais estiveram expostos a concentrações de mercúrio progressivamente mais altas nos sedimentos, mas não se observou um aumento significativo da concentração de mercúrio nos tecidos. A principal informação obtida desta experiência, portanto, é que não ocorre acumulação de mercúrio inorgânico por *Nassarius reticulatus* a partir dos sedimentos ao fim de 20 dias de experiência. Não é possível saber se este facto se deve a um eventual ciclo de absorção / eliminação de mercúrio nestes animais ou à indisponibilidade deste metal a partir dos sedimentos, uma vez que a concentração de mercúrio foi medida para todo o corpo e não para órgãos isolados. No entanto, os dados sugerem que os sedimentos podem não ser a via principal de acumulação de mercúrio a partir do ambiente, tal como os dados de campo também sugerem. Contudo, espera-se que possa ocorrer acumulação desta forma de mercúrio a partir dos sedimentos num período de tempo mais alargado, uma vez que estes animais têm uma longevidade de 4 a 10 anos (Barroso *et al.*, 2005) e, também, porque a percentagem de mercúrio inorgânico encontrada nos tecidos ao longo da costa Portuguesa é, em média, cerca de 41%. A relação entre a acumulação de mercúrio inorgânico por *N. reticulatus* e a sua

concentração nos sedimentos deverá ser testada em laboratório para períodos de tempo mais longos. Mesmo assim, assiste-se em 20 dias à bioacumulação de tributilestanho por *N. reticulatus* em condições experimentais muito semelhantes (Barroso, comunicação pessoal, 2007), o que comprova o diferente comportamento do mercúrio inorgânico em comparação com este composto organometálico.

Conclui-se que *Nassarius reticulatus* não é um bom indicador da contaminação por mercúrio inorgânico dos sedimentos. No entanto, esta espécie poderá ser útil para avaliar a presença de mercúrio nos ecossistemas e para compreender melhor a forma como este metal pode ser transferido ao longo da cadeia trófica, tendo em consideração a dieta necrófaga que este molusco apresenta.

A correlação negativa encontrada no presente estudo entre a contaminação por mercúrio nos sedimentos e nos tecidos de *Nassarius reticulatus* é um aspecto muito interessante e já foi reportada anteriormente para outros moluscos (McGeer *et al.*, 2003) e peixes (Parks *et al.*, 1989). São necessários mais estudos para clarificar os mecanismos que envolvem a acumulação de mercúrio em moluscos, e em particular em *Nassarius reticulatus*, e explicar mais claramente a relação inversa com as concentrações ambientais. De facto, através dos processos de bioacumulação e bioampliação das formas orgânicas de mercúrio, toda a cadeia alimentar envolvendo moluscos e espécies de peixes economicamente importantes pode eventualmente reter uma excessiva carga de mercúrio em regiões com baixa contaminação ambiental por este metal. Estas regiões podem apresentar uma elevada exploração pela pesca, constituindo por isso um risco inesperado para a saúde humana.

## **CAPÍTULO 5**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ANDREN, A.W. & NRIAGU, J.O., 1979. The Global Cycle of Mercury. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, J.O. Nriagu editor, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Netherlands, pp. 1-21.

ARMSTRONG, F.A.J., 1979. Effects of mercury compounds on fish. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, J.O. Nriagu editor, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Netherlands, pp. 657-670.

BARNETT, P.R.O., HARDY, B.L.S. & WATSON, J., 1980. Substratum selection and egg-capsule deposition in *Nassarius reticulatus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 45: 95-103.

BARREIRO, R., GONZÁLEZ, R., QUINTELA, M., RUIZ, J.M., 2001. Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. *Marine Ecology Progress Series*, 218: 203-212.

BARROSO, C.M., 1995. Metodologia do Estudo do Crescimento de Moluscos Bivalves e Gastrópodes. Aplicação a Duas Populações de Gastrópodes Prosobrânquios da Ria de Aveiro: *Hinia reticulata* (Linnaeus, 1758) e *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758). Trabalho de Síntese e Investigação Científica, Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, pp. 80.

BARROSO, C.M. & MOREIRA, M.H., 1998. Reproductive Cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: Implications for Imposex Studies. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 78: 1233-1246.

BARROSO, C.M., 2001. Utilização do Impossexo na Monitorização da Poluição por TBT na Costa Portuguesa, dando especial relevo ao gastrópode *Nassarius (Hinia) reticulatus* (L.). Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Doutor em Biologia. Universidade de Aveiro.

BARROSO, C.M., REIS-HENRIQUES, M.A., FERREIRA, M.S., MOREIRA, M.H., 2002a. The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82: 249-255.

BARROSO, C.M., MOREIRA, M.H., BEBIANNO, 2002b. Imposex, female sterility and organotin contamination on the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series*, 230: 127-135.

BARROSO, C.M., MOREIRA, M.H., RICHARDSON, C.A., 2005. Age and Growth of *Nassarius reticulatus* in Ria de Aveiro, North-West Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 151-156.

BECKVAR, N., FIELD, J., SALAZAR, S., HOFF, R., 1996. Contaminants in Aquatic Habitats at Hazardous Waste Sites: Mercury. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 100. Hazardous Materials Response and Assessment Division, *National Oceanic and Atmospheric Administration*. National Ocean Service. Seattle, Washington, pp. 74.

BEIRAS, R., FERNÁNDEZ, N., BELLAS, J., BESADA, V., GONZÁLEZ-QUIJANO, A., NUNES, T., 2003. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere*, 52: 1209-1224.

BELLAS, J., VÁSQUEZ, E., BEIRAS, R., 2001. Toxicity of Hg, Cu, Cd and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. *Wat. Res.*, 35: 2905-2912.

BERTO, D., GIANI, M., COVELLI, S., BOSCOLO, R., CORNELLO, M., MACCHIA, S., MASSIRONI, M., 2006. Mercury in sediments and *Nassarius reticulatus* (Gastropoda Prosobranchia) in the southern Venice Lagoon. *Science of the Total Environment*, 368: 298-305.

BESADA, V., FUMEGA, J., VAAMONDE, A., 2002. Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from de Spanish North-Atlantic coast 1991-1999. *The Science of the Total Environment*, 288: 239-253.

BRYAN, G.W. BURT, G.R., GIBBS, P.E. & PASCOE, P.L., 1993. *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom*, 73: 913-929.

CÁLDERON, J., ORTIZ-PÉREZ, D., YÁÑEZ, L., DÍAZ-BARRIGA, F., 2003. Human exposure to metals. Pathways to exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 331-345.

CALLIL, C.T. & JUNK, W.J., 2001. Aquatic gastropods as mercury indicators in the Pantanal of Poconé Region (Mato Grosso, Brasil). *Water, Air and Soil Pollution*, 319: 319-330.

CAMPBELL, A. & NICHOLIS, J., 1998. Fauna e Flora do Litoral de Portugal e Europa. Guias Fapas. Expo 98, Lisboa, pp. 320.

CANÁRIO, J., VALE, C., CAETANO, M., MADUREIRA, M.J., 2003. Mercury in contaminated sediments and porewaters enriched in sulfhate (Tagus Estuary, Portugal). *Environmental Pollution*, 126: 425-433.

CANÁRIO, J, VALE, C., CAETANO, M., 2005. Distribution of monomethyl-mercury and mercury in surface sediments of the Tagus Estuary (Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1142-1145.

CHEN, WEN-YI, WANG, YU-CHUN, KUO MAO-SUNG, 2002. Determination of Total Mercury and Methylmercury in Human Hair by Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry Using 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonate as a Complexing Agent. *Analytical Sciences*, vol.18: 255-260.

CHEUNG, S.G., WONG, W.H., 2001. Effect of food availability on the energetics of the intertidal scavenging gastropod *Nassarius festivus*. *Vie Milieu*, 51: 181-188.

CHEUNG, S.G., TAI, K.K., LEUNG, C.K., SIU, Y.M., 2002. Effects of heavy metals on the survival and feeding behaviour of the sandy shore scavenging gastropod *Nassarius festivus* (Powys). *Marine Pollution Bulletin*, 45: 107-113.

CLARK, R.B., 1992. *Marine Pollution*, third edition. Oxford University Press Inc., New York, pp. 172.

CONTI, M.E. & CECCHETTI, G., 2003. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*, 93: 99-112.

COSTLEY, C.T., MOSSOP, K.F., DEAN, J.R., GARDEN, L.M., MARSHAL, J., CARROLL, J., 2000. Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. *Analytica Chimica Acta*, 405: 179-183.

EPA, 2001. Mercury update: Impact on Fish Advisories. EPA-823-F-01-011, EPA, Washington, pp. 10.

FRANCO, J., BORJA, A., SOLAUN, O., PÉREZ, V., 2002. Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): results from an 11-year monitoring programme. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 956-976.

FOWLER, S.W., HEYRAUD, M., LA ROSA, J., 1978. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. *Marine Biology*, 46: 267-276.

FRETTER, V. & GRAHAM, A., 1984. The prosobranch molluscs of Britain and Denmark. Part 8. Neogastropoda. *Journal of Molluscan Studies*, 15, supplement, 435-556.

FRETTER, V. & GRAHAM, A., 1994. British prosobranch molluscs, their functional anatomy and ecology. The Ray Society, Dorset Press, Dorchester.

GAGGI, C., ZINO, F., DUCCINI, M., RENZONI, A., 1996. Levels of Mercury in Scalp Hair of Fishermen and Their Families from Câmara de Lobos – Madeira (Portugal): A Preliminary Study. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 860-865.

GONÇALVES, A., GONÇALVES, N.N.S., 2004. Exposição humana ao mercúrio na Amazônia brasileira: uma perspectiva histórica. *Rev. Panam. Salud. Publica* 16 (6): 415-419.

GRAHAM, A., 1988. Molluscs: prosobranch and pyramidellid gastropods. Synopses of the British fauna (new series) 2. Brill Academic Publishers, Leiden.

GREGORY, M.A., MARSHALL, D.J., GEORGE, R.C., ANANDRAJ, A., McCLURG, T.P., 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 114-125.

HYLLAND, K., KALAND, T., ANDERSEN, T., 1994. Subcellular Cd Accumulation and Cd-Binding Proteins in the Notted Dog Whelk, *Nassarius reticulatus* L. *Marine Environmental Research*, 38: 169-193.

HORNE, M.T., FINLEY, N.J., SPRENGER, M.D., 1999. Polychlorinated Biphenyl- and Mercury-Associated Alterations on Benthic Invertebrate Community Structure in a Contaminated Salt Marsh in Southeast Georgia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 317-325.

KEHRIG, H.A., COSTA, M., MOREIRA, I., MALM, O., 2002. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 1018-1023.

LAWSON, N.M. & MASON, R.P., 1998. Accumulation of mercury in estuarine food chains. *Biogeochemistry* 40: 235-247.

LIANG, L.N., SHI, J.B., HE, B., JIANG, G.B., YUAN, C.G., 2003. Investigation of Methylmercury and Total Mercury Contamination in Mollusk Samples Collected from Coastal Sites along the Chinese Bohai Sea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7373-7378.

LIANG, L.N., HE, B., JIANG, G.B., CHEN, D.Y., YAO, Z.W., 2004. Evaluation of molluscs as biomonitors to investigate heavy metal contaminations along the Chinese Bohai Sea. *The Science of the Total Environment*, 324: 105-113.

LIMBONG, D., KUMAMPUNG, J., AYHUAN, D., ARAI, T., MIYAZAKI, N., 2005. Mercury Pollution Related to Artisanal Gold Mining in North Sulawesi Island, Indonesia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75: 989-996.

MACEDO, M.C.C., MACEDO, M.I.C., BORGES, J.P., 1999. Conchas Marinhas de Portugal. Verbo, pp. 497.

MAGOS, L. & WEBB, M., 1979. Synergism and antagonism in the toxicology of mercury. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, J.O. Nriagu editor, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Netherlands, pp. 581-599.

MASON, R.P., REINFELDER, J.R., MOREL, F.M.M., 1995. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water, Air and Soil Pollution*, 80: 915-921.

MAURO, J.B.N., GUIMARÃES, J.R.D., MELAMED, R., 1999. Aguapé agrava contaminação por mercúrio. *Ciência Hoje*, vol.25, n.º 150, pp.4.

McGEER, J.C., BRIX, K.V., SKEAFF, J.M., DeFOREST, D.K., BRIGHAM, S.I., ADAMS, W.J., GREEN, A., 2003. Inverse Relationship Between Bioconcentration Factor and Exposure Concentration for Metals: Implications for Hazard Assessment of Metals in the Aquatic Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 1017-1037.

MELA, M., 2004. Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Sector de Ciências Biológicas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Panamá, pp. 124.

MILLER, J.N. & MILLER, J.C., 2000. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education Limited, Harlow Essex. England.

MORITA, M., YOSHINAGA, J., EDMONDS, J.S., 1998. The Determination of Mercury Species in Environmental and Biological Samples. Technical Report. *Pure & Applied Chemistry*, 8: 1585-1615.

MOUNTOURIS, A., VOUTSAS, E., TASSIOS, D., 2002. Bioconcentration of heavy metals in aquatic environments: the importance of bioavailability. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 1136-1141.

OEHLMANN, J., STROBEN, E., FIORONI, P., 1993. Fréquence et degré d'expression du pseudohermaphrodisme chez quelques prosobranches sténoglosses des côtes françaises (surtout de la baie de Morlaix et de la Manche). 2. Situation jusqu'au printemps de 1992. *Cahiers de Biologie Marine*, 34: 343-362.

PARKS, J.W., LUTZ, A., SUTTON, J.A., 1989. Water column methylmercury in the Wabigoon/English River-Lake System: factors controlling concentration, speciation, and net production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46: 2184-2202.

PEREIRA, M.E., 1996. Distribuição, reactividade e transporte do mercúrio na Ria de Aveiro. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Doutor em Química, especialidade de Química Analítica. Universidade de Aveiro, pp. 284.

PEREIRA, M.E., DUARTE, A.C., MILLWARD, G.E., ABREU, S.N., VALE, C., 1998. An estimation of industrial mercury stored in sediments of a confined area of the Lagoon of Aveiro (Portugal). *Water Science and Technology*, 37: 125-130.

PESSOA, M.F., 1999. Imposex em *Hinia reticulata* (L.) (Gastropoda). Um Contributo para a Biomonitorização dos Níveis de Estanho e Derivados Orgânicos no Litoral Sudoeste Português. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Ambiente pela Universidade Nova de Lisboa. Universidade Nova de Lisboa, pp. 508.

RAMALHOSA, E., PEREIRA, E., VALE, C., MONTERROSO, P., DUARTE, A.C., 2000. Remobilização de Mercúrio em Sedimentos Anóxicos Contaminados da Ria de Aveiro. *Estudos de Biogeoquímica na Zona Costeira Ibérica, IX Seminário Ibérico de Química Marinha*. Universidade de Aveiro, pp. 235-240.

RAMALHOSA, E.C., 2002. Mercúrio na Ria de Aveiro: associações, reactividade e especiação. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Doutor em Química Analítica. Universidade de Aveiro, pp. 354.

RAMALHOSA, E., PEREIRA, E., VALE, C., VÁLEGA, M., DUARTE, A.C., 2005a. Distribution of mercury in the upper sediments from a polluted area (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 50: 682-686.

RAMALHOSA, E., PEREIRA, E., VALE, C., VÁLEGA, M., MONTERROSO, P., DUARTE, A.C., 2005b. Mercury distribution in Douro Estuary (Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1218-1222.

RITCHER, E.M., 2001. Desenvolvimento e Aplicações de Eléctrodos de Ouro Confeccionados a partir de Discos Compactos Regraváveis (CD-Rs). Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, pp. 80.



ROMÉO, M., FRASILA C., GNASSIA-BARELLI, M., DAMIENS, G., MICU, D., MUSTATA, G., 2005. Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Water Research*, 39: 596-604.

SAIZ-SALINAS, J.I., RUIZ, J.M., FRANCES-ZUBILLAGA, G., 1996. Heavy metal levels in intertidal sediments and biota from the Bidasoa estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 32: 69-71.

SIEGEL, B.Z. & SIEGEL, S.M., 1979. Biological indicators of atmospheric mercury. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, J.O. Nriagu editor, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Netherlands, pp. 131-159.

SMITH, B.S., 1971. Sexuality in the american mud snail *Nassarius obsoletus* (Say). *Proceedings of the Malacological Society of London*, 39: 377-378.

SMITH, B.S., 1981. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *Journal of Applied Toxicology*, 1: 141-144.

STORELLI, M.M. & MARCOTRIGIANO, G.O., 2005. Bioindicator organisms: heavy metal pollution evaluation in the Ionian Sea (Mediterranean sea – Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, 102: 159-166.

STROBEN, E., OEHLMANN, J., FIORONI, P., 1992. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potencial indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology*, 113: 625-636.

TALLMARK, B., 1980. Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Marine Ecology Progress Series*, 3: 51-62.

TCHOUNWOU, P.B., AYENSU, W.K., NINASHVILI, N., SUTTON, D., 2003. Environmental Exposure to Mercury and Its Toxicopathologic Implications for Public Health. *Environmental Toxicology*, 18: 149-175.

UGOLINI, A., BORGHINI, F., CALOSI, P., BAZZICALUPO, M., CHELAZZI, G., FOCARDI, S., 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 526-532.

ULLRICH, S.M., TANTON, T.W., ABDRASHITOVA, S.A., 2001. Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31(3): 241-293.

VALE, C., FERREIRA, A., CAETANO, M.M., BRITO, P., 2002. Elemental composition and contaminants in surface sediments of the Mondego river estuary. In: Pardal, M.A., Marques, J.C., Graça, M.A. (Eds.), *Aquatic Ecology of the Mondego River Basin. Global Importance of Local Experience*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, pp. 243-256.

VÁLEGA, M.S., 2002. Efeito das plantas na acumulação de mercúrio em sedimentos de sapais. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre em Métodos Instrumentais e Controlo. Universidade de Aveiro, pp. 155.

VÁLEGA, M., ABREU, S., PATO, P., ROCHA, L., GOMES, A.R., PEREIRA, M.E. and DUARTE, A.C., 2006. Determination of Organic Mercury in Biota, Plants and Contaminated Sediments Using a Thermal Atomic Absorption Spectrometry Technique. *Water, Air and Soil Pollution*, 174: 223-234.

VIEIRA, L.M. & ALHO, C.J.R., 2004. Contaminação por Mercúrio em Sedimento e Moluscos da Bacia do Rio Bento Gomes, MT. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 58, Embrapa, pp. 21.

WANG, W.X. & FISHER, N.S., 1999. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. *The Science of the Total Environment*, 237/238: 459-472.

WANG, W.X. & KE, C., 2002. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. *Aquatic Toxicology*, 56: 153-165.

WHO, 1976. Environmental Health Criteria 1. *World Health Organisation*, Geneve, pp. 131.

WINDOM, H.L. & KENDALL, D.R., 1979. Accumulation and biotransformation of mercury in coastal and marine biota. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, J.O. Nriagu editor, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Netherlands, pp. 303-323.

YU, MING-HO, 2001. Environmental Metals. In: *Environmental Toxicology. Impacts of Environmental Toxicants on Living Systems*. Lewis Publishers, CRC Press, USA, pp. 151-186.