

Avaliação e caracterização ecológica de sedimentos do estuário do Sado

Maria João Ferreira Pedrosa

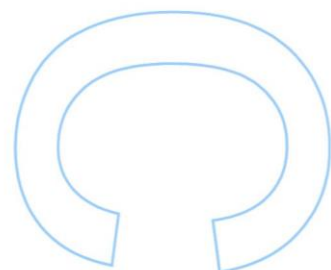
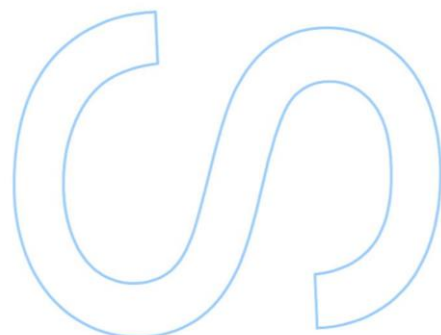
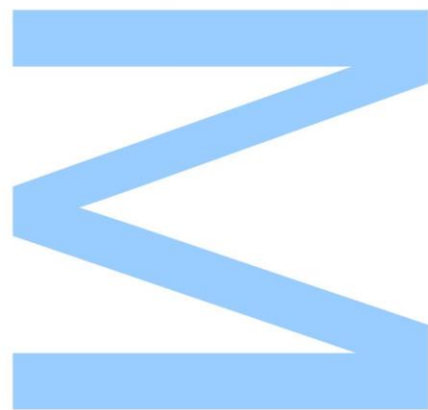
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
2020

Orientador

Doutora Carla Palma, Chefe de Divisão de Química e Poluição
do Meio Marinho, Instituto Hidrográfico - Marinha

Coorientador

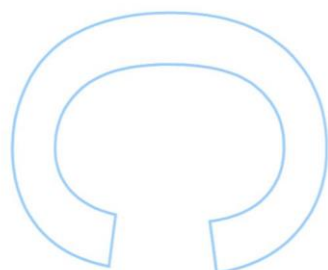
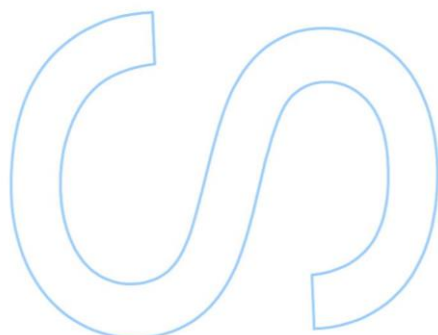
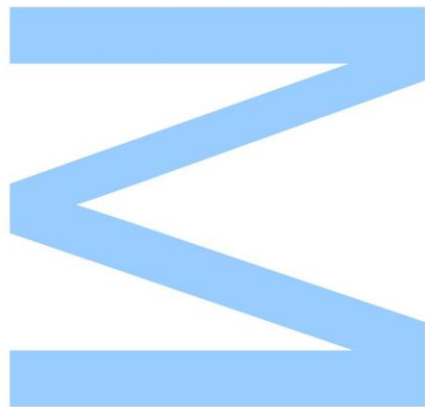
Doutora Sara Antunes, Investigadora Auxiliar do CIIMAR e
Professora Auxiliar Convidada, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

À minha orientadora Doutora Carla Palma, e coorientadora Doutora Professora Sara Antunes, por aceitarem esta proposta, e me auxiliarem durante todo o percurso com paciência e compreensão.

A toda a equipa do Instituto Hidrográfico por me terem acolhido e permitido a participação no projeto AQUASADO e no projeto AQUIMAR.

À equipa pertencente ao projeto AQUASADO (Projeto: MAR-02.01.01-FEAMP-0051), o qual se enquadrou esta dissertação, pela oportunidade de participação nas campanhas de amostragem e da utilização dos dados recolhidos.

À Divisão de Química do Instituto Hidrográfico por a dedicação na partilha de conhecimento e a disponibilidade em ajudar.

À equipa do laboratório Fr3shlab da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por toda a ajuda oferecida e também por os momentos de descontração que me proporcionaram nestes últimos meses.

À Base Naval de Lisboa por me proporcionar estadia durante os meses de estágio.

Aos meus pais sem os quais não me era possível realizar todo este percurso, e ao resto da minha família por todos os conselhos oferecidos.

À minha colega e amiga Helena Monteiro, por me aconselhar a escolha deste estágio, e por a companhia que me proporcionou em Lisboa. E a todos os meus colegas do Mestrado de Biologia e Gestão da Qualidade da Água por o espírito de entreajuda que sempre demonstraram.

À Mariana Sá, minha grande amiga americana por estar sempre ao meu lado e ser o meu maior apoio estes últimos meses.

A todos os meus amigos, especialmente José Alberto, Leandro Pereira, Miguel Tomás e Luís Magalhães, por se disponibilizarem para me ajudar e por todo o apoio e força que me deram para continuar.

Resumo

O estuário do Sado apresenta uma elevada importância ecológica, uma vez que constitui uma zona de reserva natural, com elevada riqueza biológica. Das áreas adjacentes, o estuário recebe efluentes industriais e urbanos que representam perigo para a diversidade biológica e qualidade das massas de água. Por outro lado, os sedimentos dos ecossistemas aquáticos são o principal recetor e reservatório de contaminantes provenientes da coluna de água e áreas adjacentes, pelo que a sua avaliação física e química deve ser efetuada a par com a avaliação química e biológica da coluna de água. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e caracterizar a comunidade biológica de macroinvertebrados bentónicos, e os elementos físicos e químicos dos sedimentos do estuário do Sado. Para responder a este objetivo foram efetuadas 2 campanhas de amostragem (em Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020) onde se procedeu à recolha de sedimentos em 3 locais com diferentes pressões no estuário: 1 com influência agrícola; e 2 com influência industrial. Os sedimentos foram analisados e caracterizados em termos de granulometria, pH, matéria orgânica, nutrientes e metais pesados. A comunidade de macroinvertebrados bentónicos foi utilizada para aplicação do índice biótico marinho (AMBI) e posterior classificação da qualidade ecológica da massa de água do estuário do Sado de acordo com a Diretiva Quadro da Água (DQA). Os resultados obtidos revelaram uma grande variação na composição granulométrica dos sedimentos do fim do verão para o inverno, registando-se, regra geral, uma diminuição na concentração de metais e aumento de diversidade da comunidade de macroinvertebrados bentónicos, respetivamente. A diminuição da concentração de contaminantes nos sedimentos aparenta estar relacionada com o aumento na percentagem de areia e a diminuição de matéria orgânica. Estes resultados, revelaram no geral, uma grande heterogeneidade na composição dos sedimentos do estuário do Sado. O resultado do AMBI para os locais amostrados no estuário do Sado indicaram um estado ecológico moderado em Setembro, e um bom estado ecológico em Fevereiro.

Palavras chaves: águas de transição; qualidade da água; sedimentos; comunidade bentónica.

Abstract

Sado estuary has a high ecological importance since it holds a natural reserve with high biological richness. In adjacent areas, the estuary receives industries and urban effluents that represent hazards to the biological diversity and water quality. Sediments are a sink for the materials that deposit in water bodies, thus their physical-chemical evaluation must be done apart from the water column. The present study focus on the evaluation and characterization of the biological community of benthic macroinvertebrates, and physical-chemical elements of sediments from Sado estuary. To respond to this demand, two sampling campaigns (in September of 2019 and February of 2020) were conducted with sediment collection in 3 sites with different pressures in the estuary: 1 under agricultural influence, and 2 with industrial impact. Sediments were characterized in terms of texture, pH, organic matter, nutrients and heavy metals. Benthic macroinvertebrates used for application of AMBI index and posterior classification of the ecological status of Sado estuary accordingly with the Water Framework Directive. The results obtained revealed a great variation in the general composition of summer to winter sediments, especially because there was a decrease in metals concentrations) and a growth in biological diversity. These contaminants decrease appears to be related with the increase of sand and organic matter. These results, in general, reveal a great heterogeneity in the composition of the sediments of the Sado estuary. AMBI results of the sampling sites in Sado estuary showed a moderate ecological status in September, and a good ecological status in February.

Keywords: transition waters; water quality; sediments; benthic macroinvertebrates.

Índice

1. Introdução	7
1.1. Importância ambiental dos sedimentos	8
1.2. Macroinvertebrados bentônicos	10
1.3. Estuário do Sado	12
1.3.1. Ecologia do estuário do Sado	14
1.3.2. Pressões antropogênicas do estuário	17
1.3.3. Histórico de contaminações	17
1.4. Objetivo de estudo.....	19
2. Metodologia	20
2.1. Local de estudo e Amostragem.....	20
2.2. Procedimentos Laboratoriais: análise físicas e químicas	21
2.2.1. Análise granulométrica	21
2.2.2. Análise de carbono orgânico e inorgânico total.....	22
2.2.3. Determinação do peso seco	23
2.2.4. Determinação do pH	23
2.2.5. Análise de metais pesados	23
2.2.6. Análise de Nutrientes	25
2.3. Procedimentos laboratoriais: Análise de macroinvertebrados bentônicos...	27
2.4. Análise Estatística	29
3. Resultados e discussão	30
3.1. Parâmetros Físico-químicos	30
3.2. Macroinvertebrados bentônicos	37
4. Conclusão	44
5. Bibliografia	46
6. Anexos	54

1. Introdução

Os estuários classificam-se como águas de transição, ou seja, massas de água superficiais próximas da foz de um ou mais rios, com um carácter salgado devido à proximidade de águas costeiras, mas significativamente influenciados por cursos de água doce (Agência Portuguesa do Ambiente, 2020a). Segundo a definição de Fairbridge (1980) um estuário é uma entrada do mar que chega ao vale de um rio até ao limite superior do aumento da maré, podendo ser dividido em 3 sectores: I) estuário marinho ou inferior em ligação livre com o mar aberto; II) estuário médio sujeito a grande mistura de água doce e salgada; e III) estuário superior ou fluvial caracterizado por água doce mas sujeito à ação diária das marés. Os limites entre os setores são variáveis e sujeitos a constantes mudanças provocadas pelas descargas dos rios (Day Jr. *et al.*, 2012). O regime hidrodinâmico de um estuário resulta assim da combinação de vários componentes como as correntes e processos de mistura entre a água doce e a água salgada, os ciclos de maré (semidiurnos, diurnos, semanais, quinzenais, equinociais ou anuais), o vento, tempestades, chuva e evaporação, e a variação barimétrica e geomorfológica temporal e espacial (Wolanski e Elliot, 2015).

Os sedimentos presentes num estuário têm origem fluvial e marinha, dependendo por isso da geomorfologia costeira e do leito do rio, e são misturados devido aos períodos em que o fluxo do rio é maior alternado com os períodos em que o fluxo da maré é superior. Estes também variam de acordo com o regime hidrodinâmico do estuário, uma vez que estamos perante elementos móveis. A sua dinâmica, com eventos de deposição/erosão, pode ocorrer a escalas temporais de milénios (escalas temporais geomorfológica), mas é também influenciada por fenómenos de maré, tempestade, períodos de cheias, sazonalidade e turbulência (segundos a minutos), mas ocorre também em ciclos diários (vazante – cheia), semanais (marés vivas – mortas), lunares, equinocial e sazonais (estações húmidas – secas). O tipo de sedimentos que se encontra tanto no fundo como na coluna de água determinam a estrutura das comunidades biológicas que aí se podem encontrar, e tem também repercussões no destino e efeito de contaminantes, no uso e exportação de nutrientes, e na produtividade estuarina (Wolanski e Elliot, 2015).

As zonas adjacentes dos estuários são, já há muito tempo, das áreas mais populosas no mundo (Wolanski e Elliot, 2015), devido principalmente à elevada produtividade. Schelske e Odum (1962) relacionam a elevada produtividade de um estuário com 4 fatores:

1) quantidade de produtores primários; 2) fatores que produzem movimentos de água complexos como a ação da maré, vento, ondas, correntes fluviais, etc.; 3) suplemento de nutrientes abundante; 4) rápida regeneração e conservação de nutrientes devido à atividade de microrganismos e organismos filtradores. As zonas húmidas intertidais, devido a serem grandes produtoras de detritos orgânicos – importante fonte de energia no estuário – e por servirem como berçário para muitas espécies marinhas e estuarinas, são uma componente importante na produtividade de um estuário. Para além disto, regulam a química estuarina, já que é nestas zonas onde ocorrem muitas reações químicas importantes, e apresentam também um papel importante na alimentação de uma variedade de consumidores estuarinos devido à exportação dos detritos orgânicos (Day Jr. *et al.*, 2012). A elevada produtividade das áreas estuarinas confere-lhes um carácter ecológico importante, traduzido principalmente pelo papel fundamental que detêm no ciclo de vida de muitos peixes, aves e invertebrados, mas também o interesse socioeconómico da sua exploração que leva à ação legislativa para garantir a sustentabilidade da sua biodiversidade e, assim, a saúde ecológica destas regiões (Garcês e Costa, 2009).

1.1. Importância ambiental dos sedimentos

No ambiente aquático os sedimentos interagem fortemente com a água por processos de adsorção e co-precipitação que ocorrem entre a coluna de água e a matéria suspensa. As águas intersticiais dos sedimentos são influenciadas pelos compostos sedimentados através de processos de difusão, consolidação e bioturvação, podendo mesmo influenciar a concentração na coluna de água (Salomons, 1885). Esta capacidade de reservatório (Garcês e Costa, 2009), tem especial importância na ocorrência e persistência de agentes poluentes. Os micropoluentes podem ser removidos da coluna de água por adsorção da matéria suspensa e subsequente sedimentação, e parte dos poluentes acumulados pode ser libertado para a coluna de água ou para os aquíferos, se ocorrer infiltração (Salomons, 1885). Para além do fator ambiental, a presença de poluentes nos sedimentos, pode também afetar valores económicos já que tem efeitos diretos em organismos bentónicos (Salomons, 1885) que podem ser espécies com interesse comercial ou presas dessas espécies (Garcês e Costa, 2009).

A importância dos sedimentos no ambiente aquático é reconhecida pela Diretiva Quadro de Água como elemento na avaliação da qualidade da água. A sua avaliação é definida pela Norma de Qualidade Ambiental como a concentração de determinado

poluente ou grupo de poluentes - não só na água e biota como nos sedimentos - que não deve ser ultrapassada para efeitos de proteção da saúde humana e do ambiente. Os valores a cumprir são da responsabilidade de cada Estados Membros que deve decidir e fixar normas que garantam esta proteção (Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000).

Em Portugal, a Diretiva Quadro de Água foi transposta para ordem jurídica nacional pela Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro (Lei da Água). Já as Normas de Qualidade Ambiental são determinadas no Anexo II do Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de outubro (Alteração do Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de setembro) apenas para a coluna de água, embora o artigo também refira a avaliação de sedimentos. Para além desta diretiva, a Diretiva Quadro Estratégia marinha (Diretiva 2008/56/CE alterada pela Diretiva (UE) 2017/845 convida os Estados-Membros a elaborar estratégias para as águas marinhas sob soberania ou jurisdição nacional de forma a alcançar o bom estado ambiental do meio marinho. Em Portugal, esta diretiva foi transposta pelo Decreto-Lei n.º 108/2010, de 13 de outubro, o qual define como valores de referência de metais e outros compostos orgânicos, os valores de concentração de fundo estabelecidos pela OSPAR (Convenção para a Proteção do Meio Marinho do Atlântico Nordeste). No Anexo III da Portaria n.º 1450/2007 de 12 de Novembro que segue a aprovação da Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro, são também referidos valores para alguns metais e compostos orgânicos para caracterizar material dragado ao nível de contaminação (Tabela I. de anexos).

As características dos sedimentos influenciam fatores como a contaminação e a comunidade biológica que os habitam. O tamanho das partículas do sedimento tem um papel essencial pois sedimentos mais finos, e por isso com uma maior área superficial e mais locais de ligações catiónicas, tem uma maior tendência a serem contaminados. No entanto, um contaminante nas mesmas concentrações, quando em sedimentos mais grossos, é mais tóxico uma vez que vai ocorrer nos poros aquosos do sedimento. Outro fator muito importante é o pH, já que demonstra grande controlo na especiação e biodisponibilização de metais, e ainda tem influência nas concentrações de amónia. Nos sedimentos, o pH relaciona-se com a quantidade de carbono orgânico disponível, devido a reações secundárias provocadas pelas comunidades microbianas (Simpson e Batley, 2016). A matéria orgânica presente nos sedimentos é também associada a uma maior concentração de poluentes como os metais, devido há capacidade de ligação às partículas de sedimento finas (Mohamed *et al.*, 2017).

1.2. Macroinvertebrados bentônicos

Os primeiros ~10 cm de sedimentos (devido às taxas de sedimentação serem inferiores a 1 cm/ano) são utilizados como refúgio, habitat e recurso alimentar de vários organismos biológicos (Simpson e Batley, 2016). Os macroinvertebrados bentônicos são organismos que habitam os sedimentos de muitos ambientes marinhos, vivendo sobre o sedimento (epifauna), em sistemas de tocas entre grãos de areia, ou em tubos de grãos de areia cimentados com muco (endofauna), construídos pelos próprios organismos. Os sedimentos superficiais são habitados maioritariamente por bivalves (Bivalvia), minhocas de cerdas (Polychaeta), pequenos crustáceos (Crustacea como anfípodes e isópodes) e equinodermes (Echinodermata) (Degraer *et al.*, 2006) (Figura 1).

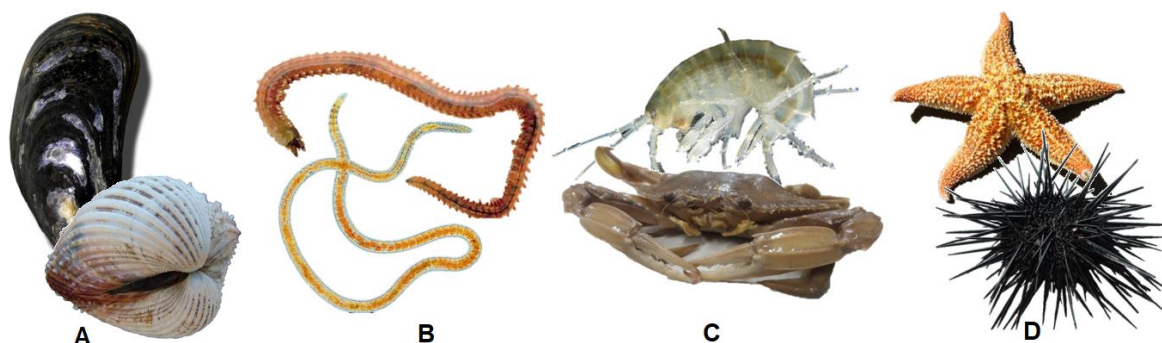


Figura 1: Organismos representativos de: A – Bivalvia; B – Annelida; C – Crustacea; D – Echinodermata.

Como estes organismos são relativamente sedentários, e por isso incapazes de evitar condições de baixa qualidade de água ou sedimento, na presença de contaminantes ou outros impactos ambientais podem ser altamente afetados (Garcês e Costa, 2009; Borja *et al.*, 2000). Para além disto, os invertebrados bentônicos têm um tempo de vida relativamente longo o que permite correlacionar as condições da qualidade da água/sedimentos com uma escala temporal. Por outro lado, exibem diferente tolerância ao stress, e representam um papel importante no ciclo de nutrientes e matéria orgânica entre os sedimentos e a coluna de água (Borja *et al.*, 2000). A comunidade macrobentônica auxilia no ciclo de nutrientes (Figura 2) transformando os detritos orgânicos em nutrientes dissolvidos que, por sua vez, podem ser usados por plantas macrófitas e algas, aumentando a produtividade primária. Para além disto, algumas espécies bentônicas omnívoras alimentam-se destes produtores primários e de zooplâncton, e servem também como alimento para peixes. Ao causarem mistura de sedimentos e consumirem diversos

recursos, podem, diretamente ou indiretamente, influenciar a produção microbiana e libertar gases de estufa (CO_2 e CH_4), gases tóxicos (H_2S e NH_4), e nitrogénio (N_2) (Covich *et al.*, 1999), assim como favorecem a distribuição de oxigénio no fundo e ajudam a fixar o sedimento (Degraer *et al.*, 2006).

Como elementos biológicos, os macroinvertebrados bentónicos servem de medidas diretas para avaliação da condição da biota, podendo revelar problemas não detetáveis ou subestimados por métodos não biológicos, e ainda funcionam como uma forma de medição do progresso dos esforços de recuperação (Dauer, 1993). Estas características tornam os invertebrados bentónicos excelentes bioindicadores reconhecidos como elementos biológicos para diversas tipologias de massas de água definidas na Diretiva Quadro de Água.

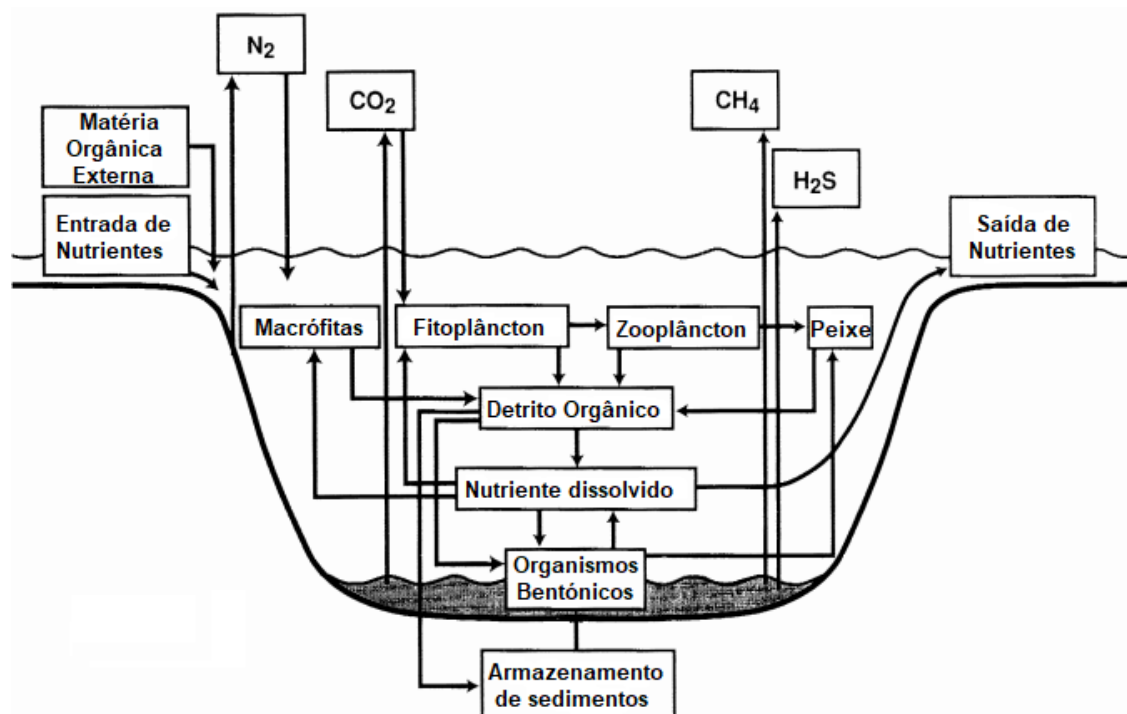


Figura 2: O papel da comunidade bentónica de macroinvertebrados na reciclagem de nutrientes e no controlo do fluxo de saída de nutrientes dos ecossistemas marinhos. Adaptado de Covich *et al.*, 1999.

Para águas de transição, a Diretiva Quadro de Água define os macroinvertebrados bentónicos como elemento biológico de avaliação do estado ecológico que se traduz em: excelente quando “o nível de diversidade e abundância dos taxa de invertebrados está dentro dos valores normalmente associados a condições não perturbadas e estão

presentes todos os taxa sensíveis às perturbações associados a condições não perturbadas”; bom quando “o nível de diversidade e abundância dos taxa de invertebrados está ligeiramente fora dos valores normalmente associados às condições específicas desta tipologia de massa de água e está presente a maioria dos taxa sensíveis das comunidades específicas destas massas de água”; razoável quando “o nível de diversidade e abundância dos taxa de invertebrados está moderadamente fora dos valores normalmente associados às condições específicas desta tipologia de massa de água, estão presentes taxa indicadores de poluição e estão ausentes muitos dos taxa sensíveis das comunidades específicas destas massas de água” (Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000).

A tradução da Diretiva Quadro de Água para a legislação portuguesa acontece no Decreto-Lei n.º 77/2006 de 30 de março cuja última alteração é Decreto-Lei n.º 42/2016 de 1 de agosto. Os planos de gestão de Região Hidrográfica 2016/2021 utilizam o índice multimétrico Benthic Assessment Tool – BAT (Teixeira *et al.*, 2009), para ser aplicado a dados de abundância de macroinvertebrados que foram recolhidos de habitats subtidais de substrato móvel como areia fina ou vasosa. Este índice multimétrico articula os resultados dos indicadores ecológicos Margalef index – d (Margalef, 1968), Shannon-Wiener index – $H'(\log 2)$ (Shannon e Weaver, 1963) e AZTI's Marine Biotic Index – AMBI (Borja *et al.*, 2000).

1.3. Estuário do Sado

O estuário do Sado (Figura 3) é um estuário mesotidal com uma hidromorfologia homogénea (Gonçalves *et al.*, 2015), exceto nos meses de inverno onde acontecem grandes descargas de água doce verificando-se estratificação (Garcês e Costa, 2009). Este sistema com um volume de água de $500 \times 10^6 \text{ m}^3$, tem um tempo de residência de água médio de cerca de 1 mês (Gonçalves *et al.*, 2015). As marés semidiurnas, variam entre os 1,6 m em período de marés vivas e 0,6 m em períodos de marés mortas (Lillebø *et al.*, 2011).

O principal fluxo de entrada de água doce no estuário do Sado é proveniente do rio Sado com uma variação sazonal de $1 \text{ m}^3/\text{seg}$ nos verões e $250 \text{ m}^3/\text{seg}$ nos invernos (Psuty e Moreira, 2000). O rio Sado nasce na serra do Caldeirão e percorre cerca de 175 km na direção sudeste – noroeste até desaguar na porção sul do estuário do Sado em Setúbal (Ribeiro *et al.*, 2009; Psuty e Moreira, 2000). Ao longo do seu percurso foram construídas 14 barragens que desviam o fluxo superficial de água por redes de irrigação – já que o rio

corre maioritariamente por áreas rurais (Ribeiro *et al.*, 2009) – e ao mesmo tempo, diminuem a quantidade de sedimentos que atinge a foz do estuário (Psuty e Moreira, 2000). No estuário do Sado desaguam ainda dois canais, identificados na Figura 3 um a sul, o canal da Comporta que apenas efetua descargas no estuário em breves períodos de tempestade; e outro mais a norte, o canal da Marateca com um fluxo de entrada que varia igualmente de forma sazonal com cerca de 0 m³/seg nos verões e 10 – 12m³/seg nos invernos (Psuty e Moreira, 2000).



Figura 3: Mapa do estuário do Sado com os seus afluentes, e a sua localização na Península Ibérica (*adaptado de ESRI*).

A geologia do estuário consiste numa formação oxidada do Plio-Pleistoceno com dunas do tardio Pleistoceno, e quanto à profundidade média, na sua maioria é de 3 m (Psuty e Moreira, 2000) exceto na zona do Porto de Setúbal onde foram construídos canais mais profundos para facilitar a navegação, ocorrendo profundidades de 50 m na ligação com o oceano Atlântico (Cabrita *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2015). Este estuário, tipo lagoa (Garcês e Costa, 2009) tem grande importância na economia da sociedade local (Lillebø *et al.*, 2011) visto que, para além da exploração pesqueira e da aquacultura na área (Cabrita *et al.*, 2020) e das grandes áreas de exploração agrícola e industriais que rodeiam o estuário (Gonçalves *et al.*, 2015), é também uma área importante para o turismo na região na margem da Península de Troia (Costa *et al.*, 2008). Para além disto, a maior parte do

estuário do Sado é considerada uma reserva natural de grande importância ambiental (Gonçaves *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2009).

1.3.1. Ecologia do Estuário do Sado

O estuário do Sado tem elevada importância ecológica devido ao número de habitats (Tabela 1) que integra e ao número de espécies (Tabela 2) que nele habitam. Destaca-se a existência de uma comunidade biológica de elevada riqueza devido principalmente às elevadas taxas de produção primária que resultam no desenvolvimento de complexas teias alimentares (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, 2020a; Sequeira *et al.*, 2009). Devido a este grande fator ecológico, o estuário do Sado recebeu uma série de estatutos nacionais e internacionais:

- **Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES):** decretado pelo DL nº 430/80, de 1 de outubro, com o objetivo de assegurar a manutenção da predisposição natural do estuário, o desenvolvimento de atividades que permitam manter o equilíbrio do seu ecossistema, e a exploração dos recursos de forma sustentável, entre outros. A reserva abrange áreas nos concelhos de Setúbal, Palmela, Alcácer do Sal e Grândola tendo uma área total de 23 160 hectares, constituído por planícies aluviais com uma altitude média entre os 10 e os 20 metros, mas também por outros tipos de formações como dunas, praias (fluviais e marítimas) e afloramentos plistocénicos e miocénicos. Ambas as margens são compostas por sapais que são interrompidos por esteiros e canais (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, 2020b).
- **Sítio Estuário do Sado – Sítio de Importância Comunitária:** Rede Natura 2000, decretado pelo DL n.º 140/99, de 24 de abril, ao abrigo da Diretiva 92/43/CEE do Conselho, de 21 de maio de 1992, também conhecida como Diretiva Habitats (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2012a). O Sítio tem uma área total de 30 986 ha, dos quais 24 081 são terrestres e 6 905 são marinhos, abrangendo áreas nos mesmos concelhos abrangidos por a RNES e ainda no concelho de Vendas Novas (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, 2020a).

- **Zona de Proteção Especial para as Aves:** decretado pelo DL n.º 140/99, de 24 de abril, republicado pelo DL n.º 49/2005, ao abrigo da Diretiva 79/409/CEE, revogada pela Diretiva 2009/147/CE também conhecida como Diretiva Aves (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2012b). Esta zona abrange zonas nos mesmos concelhos que são abrangidos por a RNES e têm uma área total de 24 633 ha (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, 2020c).
- **Sítio Ramsar:** pela Convenção de Ramsar, também conhecida como Convenção sobre Zonas Húmidas com interesse internacional para as aves aquáticas que foi assinada por Portugal em 1980 no Decreto n.º 101/80, de 9 de outubro e ratificada em 24 de novembro desse mesmo ano, tendo entrado em vigor no dia 24 de março de 1981. Este título deve-se à designação da Comissão Europeia do estuário do Sado como Área Importante para as Aves Europeias (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2012c).
- **Biotipo CORINE:** projeto experimental de recolha, coordenação e harmonização da informação sobre o estado do ambiente e dos recursos naturais proposto como programa de trabalho da Comissão da União Europeia transposto pela Decisão 85/338/CEE, mais tarde alterada pela Decisão 90/150/CEE.

Tabela 1: Habitats prioritários naturais e semi-naturais constantes do anexo B-I do Decreto-Lei n.º 49/2005 (*adaptado de Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, 2020b*).

Lagunas costeiras

Dunas fixas com vegetação herbácea («dunas cinzentas»)

Dunas fixas descalcificadas atlânticas (*Calluno-Ulicetea*)

Dunas litorais com *Juniperus* spp.

Dunas com florestas de *Pinus pinea* e ou *Pinus pinaster*

Charcos temporários mediterrânicos

Charnecas húmidas atlânticas temperadas de *Erica ciliaris* e *Erica tetralix*

Florestas aluviais de *Alnus glutinosa* e *Fraxinus excelsior* (Alno-Padion, Alnion incanae, Salicion albae)

Tabela 2: Espécies da fauna e flora constantes dos anexos B-II, B-IV e B-V do D.L n.º 49/2005 de 24 de Fevereiro (adaptado de Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, 2020a).

	Flora	Fauna
Anexo B-II	<i>Armeria rouyana</i>	<i>Alosa fallax</i>
	<i>Herniaria marítima</i>	<i>Lampetra</i> sp. (larvas)
	<i>Jonopsidium acaule</i>	<i>Mauremys leprosa</i>
	<i>Limonium lanceolatum</i>	<i>Lutra lutra</i>
	<i>Linaria ficalhoana</i>	<i>Microtus cabreræ</i>
	<i>Melilotus segetalis</i> ssp. <i>Fallax</i>	<i>Barbastella barbastellus</i>
	<i>Myosotis lusitânica</i>	<i>Tursiops truncatus</i>
	<i>Myosotis retusifolia</i>	
	<i>Santolina impressa</i>	
	<i>Thorella verticillatundata</i>	
	<i>Thymus camphoratus</i>	
Anexos B-IV e B-V	<i>Thymus carnosus</i>	
	<i>Cladonia mediterrânea</i>	<i>Discoglossus galganoi</i>
	<i>Thymus capitellatus</i>	<i>Rana perezi</i>
		<i>Triturus marmoratus</i>
		<i>Hyla arborea</i>
		<i>Pelobates cultripès</i>
		<i>Felis silvestris</i>
		<i>Genetta genetta</i>
		<i>Herpestes ichneumon</i>
		<i>Mustela putorius</i>
		<i>Eptesicus serotinus</i>
		<i>Myotis daubentonii</i>
		<i>Pipistrellus pipistrellus</i>
		<i>Plecotus austriacus</i>
		<i>Tadarida teniotis</i>

No estuário do Sado podemos encontrar uma abundante e diversificada comunidade de macroinvertebrados, sobretudo em espécies de anelídeos, crustáceos e moluscos, muitas das quais importantes pelo seu valor comercial (crustáceos: *Crangon crangon*, *Palaemon serratus* e *Carcinus maenas*; anelídeos: *Marphysa sanguinea*, *Diopatra neapolitana* e *Hediste diversicolor*; e moluscos: *Sepia officinalis*, *Cerastoderma edule* e *Scrobicularia plana*). Contudo as comunidades mais importantes, devido à riqueza específica que aí ocorre, são os peixes (total de 111 espécies inventariadas) e as aves aquáticas (alberga cerca de 25 000 indivíduos de cerca de 40 espécies) (Sequeira *et al.*, 2009). O estuário do Sado é ainda reconhecido por ser habitat para espécies como o golfinho roaz (*Tursiops*

truncatus), e a lontra (*Lutra lutra*, uma das espécies euroasiáticas com a habilidade natatória (Oliveira *et al.*, 2008) que possui um estatuto de conservação de Quase Ameaçada de acordo com Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade (2020d).

1.3.2. Pressões antropogénicas no Estuário do Sado

O estuário do Sado, como qualquer outro estuário, concentra grande atividade antropogénica que tende a ter um impacto negativo na qualidade da água e dos sedimentos estuarinos (Sequeira *et al.*, 2009). Ao redor do estuário do Sado, há uma grande concentração urbana, industrial - fábricas de químicos, de papel, pesticidas e de comidas processadas, e uma unidade termoelétrica (Costa *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009) – e agrícola. E embora a implementação de diversas ETAR, que desaguam no estuário (Ribeiro *et al.*, 2009), várias funcionam apenas com tratamento preliminar e ainda 44% das fontes de poluição identificadas no estuário descarregam diretamente para as linhas de água de acordo com o relatório da INAG (2000). Ainda dentro do estuário decorrem diversas atividades antrópicas que também exercem pressão sobre o ecossistema, como a aquacultura, a pesca, os estaleiros navais, e ainda as dragagens efetuadas para criar e manter canais de navegação (Garcês e Costa, 2009). Os estaleiros navais albergam uma série de processos que resultam numa quantidade significativa de diversos resíduos, como petróleo, tintas anticrustantes, solventes e restos de metais. Mais ainda, as dragagens representam um risco ambiental com elevado significado, devido à transferência destes materiais para a coluna de água onde se voltam a tornar biodisponíveis, podendo ocorrer fenómenos de bioacumulação e bioamplificação nas teias tróficas aquáticas (Cabrita *et al.*, 2020). Para além disto, as margens do rio Sado não só representam uma área agrícola abundante, mas também têm um historial de atividade mineira e por isso afloramentos de pirite que vão sendo erodidos, têm contribuído para a entrada de metais como o Cádmio, Zinco e Cobre, e ainda de Mercúrio e Chumbo no estuário (Lillebø *et al.*, 2011).

1.3.3. Histórico de contaminação do estuário

Devido às pressões a que o estuário do Sado está sujeito, a avaliação da contaminação deste ecossistema aquático tem sido alvo de diversos estudos sobre a avaliação de contaminantes quer na coluna de água, quer na biota e mesmo nos sedimentos.

Caeiro *et al.* (2005) efetuou a avaliação da contaminação por metais pesados no estuário do Sado e refere padrões espaciais associados a fontes urbanas e industriais. Nos resultados obtidos nesse estudo concluiu-se que Cádmio se encontrava a níveis preocupantes seguido pelo Arsénio e Cobre enquanto que Zinco, Chumbo, Crómio e Mercúrio foram encontrados apenas em níveis de contaminação vestigial. Valença *et al.* (2012), num estudo sobre os metais nos sedimentos do estuário do Sado, comparou os valores obtidos com os valores OSPAR (2008) e observaram que o Arsénio, o Cobre, o Chumbo e o Zinco se encontravam em valores superiores em praticamente todos os locais amostrados. Para além destes estudos referentes à concentração de metais nos sedimentos do estuário do Sado, Costa *et al.* (2008) avaliou o efeito de contaminantes metálicos e orgânicos em *Solea senegalensis*. Costa *et al.* (2008) refere que foram encontradas maiores concentrações de metais no local de amostragem mais perto do porto marítimo de Setúbal, sendo o maior valor referido para o Zinco ($312,23 \text{ mg kg}^{-1}$). Mais ainda, Costa *et al.* (2008) também concluíram que metais como o Cádmio, o Arsénio, o Chumbo e o Cobre apresentaram um efeito genotóxico tão forte como outros contaminantes orgânicos, no entanto, mas mais retardado.

Quanto a estudos que avaliaram carga de nutrientes no estuário do Sado, Gonçalves *et al.* (2015) abordou a concentração de nutrientes azotados. Nesse estudo os autores pretendiam demonstrar a influência tidal e espacial nos compostos azotados do estuário, e obtiveram os seguintes intervalos de valores: Nitrato + Nitrito – 1,4 a $1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$; Amónia – 1,6 a $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$; e Oxido Nitroso foi encontrado em níveis de supersaturação na zona da baía.

Na análise biológica, focada no estudo da comunidade macrobentónica, destacam-se os estudos de Carvalho *et al.* (2001) e Cabral *et al.* (2020). Carvalho *et al.* (2001) identificou 13 179 indivíduos de 151 espécies, sendo que as mais abundantes e frequentes pertenciam à classe Polychaeta (*Spiochaetopterus costarum*, *Aonides oxycephala*, *Tharyx sp.*, *Melinna palmata*, *Scoloplos armiger*, *Caulleriella alata*, *Caulleriella bioculata* e *Lumbrinereis gracilis*). Outras espécies também frequentemente observadas foram *Ampelisca spp.* (Amphipoda), *Corbula gibba* e *Modiolus cf. adriaticus* (Bivalvia), e *Nassarius incrassatus* (Gastropoda). O estudo também concluiu que após a ocorrência de dragagens diversas espécies marinhas foram ocupando a área de espécies típicas estuarinas, e registou-se um aumento da abundância e riqueza principalmente de espécies que preferem zonas com grande enriquecimento orgânico. Cabral *et al.* (2020) identificou 81 espécies, num estudo que pretendia demonstrar a capacidade de invasão em diferentes estuários, no entanto, como

o estudo se focava apenas em espécies invasoras, só são referidas as 3 encontradas no estuário do Sado: *Chaetopleura angulata*, *Dyspanopeus texanus* e *Ruditapes philippinarum*.

O relatório intercalar do 2º e 3º ciclo do Plano de Gestão de Região Hidrográfica (Agência Portuguesa do Ambiente, 2019a), demonstrou que o estuário do Sado apresenta bom estado químico. No entanto, este relatório também demonstrou que a parte do estuário adjacente ao canal de Águas de Moura e à parte final do estuário, junto ao centro da cidade de Setúbal, apresenta um estado ecológico apenas de razoável, sendo que o resto do estuário apresenta bom estado ecológico (Figura I. de Anexos).

1.4. Objetivo do estudo

O presente trabalho está enquadrado no âmbito do projeto AQUASADO, cujo objetivo é estudar a qualidade da água do Sado, avaliando a capacidade de carga do sistema, com vista ao desenvolvimento sustentável da aquacultura no estuário do Sado (Aguasado, 2020). O objetivo específico do presente trabalho debruçou-se sobre a avaliação da qualidade ecológica do estuário do Sado, com base na comunidade de macroinvertebrados bentónicos, e nos parâmetros físicos e químicos de suporte geral e concentração de metais.

2. Metodologia

2.1. Local de estudo e amostragem

O local de estudo, estuário do Sado (representado na Figura 4), localizado na costa sudoeste de Portugal (Garcês e Costa, 2009), é o segundo maior estuário português (Gonçalves *et al.* 2015) e uma das maiores áreas estuarinas da Europa (Costa *et al.*, 2008). O clima é tipicamente mediterrâneo com verões quentes e secos e invernos frios e húmidos (Psuty e Moreira, 2000), sendo a temperatura superficial da massa de água variável entre os 10 °C e os 26 °C (Cabral *et al.* 2020).

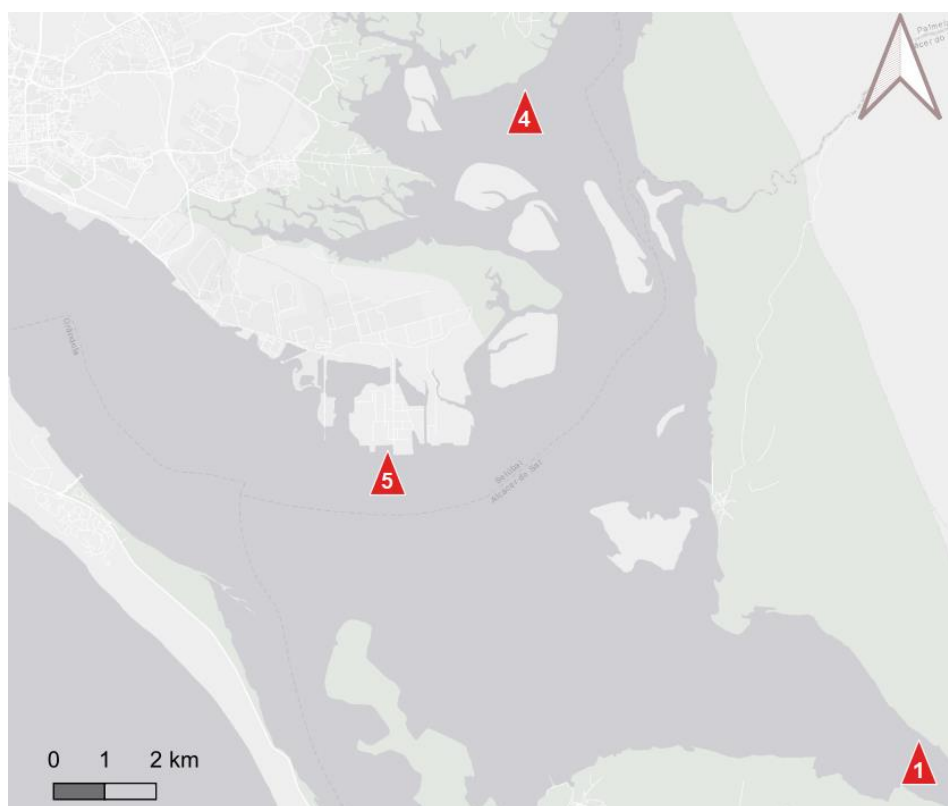


Figura 4: Mapa do estuário do Sado com os locais de recolha de sedimentos. A profundidade média dos locais 1 e 4 foi de 2 m, e no local 5, cerca de 25 m. Coordenadas: 1 – N 38° 24' 56,5" W 008° 40' 18,0"; 4 – N 38° 31' 20,0" W 008° 45' 56,4"; 5 – N 38° 28' 15,1" W 008° 47' 38,6". (adaptado de ESRI).

O plano experimental do presente estudo foi enquadrado no projeto AQUASADO. Assim, foram definidos 3 locais de amostragem (Figura 4): o local 1 fortemente influenciado pela atividade agrícola local com uma profundidade de média de 3 m; o local 4 junto aos

canais de Águas de Moura, com alguma influência agrícola, mas também industrial, com profundidade média de 1,5 m; e o local 5, junto ao estaleiro naval e por isso fortemente influenciado por esta indústria, com profundidade de aproximadamente 25 m. As amostragens em cada local decorreram em Setembro de 2019 (correspondente ao fim do Verão, refletindo “worst case scenario”) e outra em Fevereiro de 2020 (correspondente ao Inverno).

Durante o período de baixa-mar, em cada campanha de amostragem, e a partir de embarcações do tipo bote, foram recolhidas amostras de sedimento com dragas do tipo Petit Ponnar. Em cada local foram efetuadas colheitas em triplicado. As amostras colhidas para caracterização física e química foram conservadas no frio a -18 °C. As amostras colhidas para a caracterização da comunidade de macroinvertebrados bentónicos foram conservadas de imediato em formol a 4 % e adicionou-se Rosa de Bengala, de modo a corar o material biológico para uma mais fácil visualização (Rumohr, 2009).

2.2. Procedimentos Laboratoriais: análise físicas e químicas

Os laboratórios do Instituto Hidrográfico (IH) têm um conjunto alargado de métodos de ensaio acreditados de acordo com a ISO 17025 2005, sendo o controlo de qualidade analítico interno e externo efetuado de acordo com os requisitos definidos pelo laboratório. Nomeadamente é efetuada a realização de duplicados, ensaios em branco e de recuperação, a utilização de materiais de referência certificados (MRC) e a participação em ensaios interlaboratoriais (EIL).

2.2.1. Análise granulométrica

A análise granulométrica foi efetuada através, método de peneiração e método de difração a laser de acordo com as normas NP EN 933-1 e ISO 13320 – Particle Size Analysis – Laser Diffraction Methods, respectivamente. A análise foi efetuada apenas em uma réplica de cada ponto de recolha, escolhida aleatoriamente.

O método tem como princípio a separação das partículas constituintes do sedimento em discretas classes de tamanhos, e inicia-se pela homogeneização e destruição da matéria orgânica efetuada por com peróxido de hidrogénio de volume crescente (30 a 130 volumes) ao longo de 3 a 4 dias seguida de banho maria a 80°C durante 5 a 9 dias. Depois deste processo, as amostras foram lavadas usando velas de porcelana sob o sistema de vácuo. De seguida procede-se à separação a húmido de uma porção representativa de

cada amostra utilizando um peneiro de 500 µm: a fração retida no peneiro superior a 500 µm é seca em estufa a 105 °C e peneirada para separação em classes granulométricas diferenciadas; a fração inferior a 500 µm é igualmente seca, pesada e posteriormente analisada num sedimentógrafo laser. O método de peneiração utiliza uma coluna de peneiros que estão em agitação num agitador em contínuo. Após a agitação, o conteúdo de cada peneiro é pesado. O método de difração a laser consiste na medição da distribuição das dimensões das partículas do sedimento, disperso num meio líquido, recorrendo ao fenómeno da dispersão de um feixe laser incidente.

A classificação das amostras foi efetuada utilizando a escala granulométrica logarítmica Wentworth (1922) e a classificação textural de Shepard (1954), usando como base o diagrama triangular.

2.2.2. Análise de Carbono orgânico e inorgânico total

O método seguiu a norma interna do IH, e a análise foi efetuada apenas uma réplica de cada ponto de recolha, escolhida aleatoriamente.

A quantificação do carbono orgânico total (COT) é efetuada pela diferença entre o carbono total (CT) e o carbono inorgânico total (CIT). O CT determina-se por medição do dióxido de carbono produzido na combustão e catalisação complementar do carbono total presente na amostra.

A determinação do CIT baseia-se na medição do dióxido de carbono produzido na reação da fração de carbonato, sob a forma de CaCO_3 , com o ácido orto-fosfórico. Esta reação ocorre num vaso incluído num circuito contendo um gás de arraste, constituído por oxigénio, o qual transporta o CO_2 produzido para o detetor.

Ambas as deteções do CT e CIT foram efetuadas por espectrometria de absorção de infravermelhos não dispersiva, num espectrómetro de infravermelhos STRÖHLEIN Cmat 5500.

2.2.3. Determinação do peso seco

A determinação de peso seco foi efetuada de acordo com o método interno do IH. O processo de determinação envolve a secagem em estufa a 105 °C, arrefecimento em exsiccador e pesagem em balança analítica. Os resultados expressam o teor de humidade e são expressos em percentagem (%) ou g kg⁻¹.

2.2.4. Determinação do pH

O procedimento de determinação de pH segue a metodologia definida na norma ISO 10390:2005 (E). Foi criada uma suspensão de solo contendo 5 vezes o seu volume de água. O pH é então medido na suspensão através dos elétrodos do medidor de pH, à temperatura de 20 a 25 °C.

2.2.5. Análise de metais pesados

As amostras foram previamente preparadas para análise, sofrendo crivagem com peneiro de malha de 2 mm seguida de congelação e liofilização, e finalizando com uma moagem de 20 minutos. De seguida procede-se à digestão da amostra com ácidos fortes em micro-ondas.

A análise quantitativa foi feita por espectrofotometria de absorção atómica com chama, vapor frio ou gerador de hidretos, consoante o metal analisado. Através de reta de calibração ou através do método da adição padrão é efetuada a quantificação dos metais nas amostras de sedimento. Os metais analisados foram Alumínio (Al), Mercúrio (Hg), Cádmio (Cd), Crómio (Cr), Lítio (Li), Manganês (Mn), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Arsénio (As) e Níquel (Ni), e o método experimental seguido em cada uma das análises encontra-se descrito sucintamente na Figura 5. Os resultados são corrigidos relativamente ao teor de peso seco. Para além disso também foi efetuada uma normalização da concentração de todos os metais com a concentração de Al, para comparação com os valores de referência OSPAR (OSPAR commission, 2014), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Valor Normalizado} = [\text{Metal}] / [\text{Al}] * 5$$

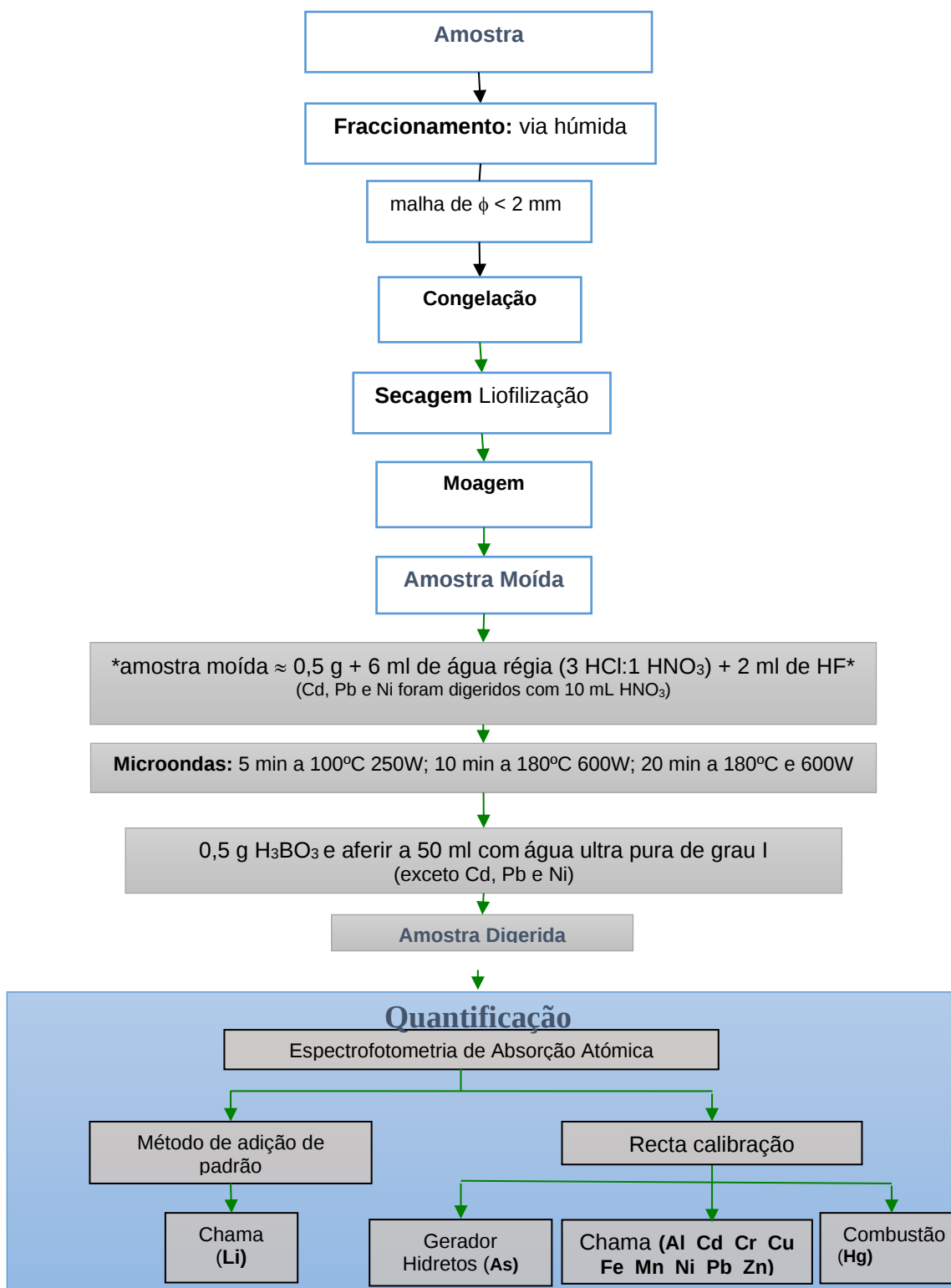


Figura 5: Esquema dos métodos necessários para a análise de metais *Adaptado* de Palma e Valença (2006).

2.2.6. Análise de nutrientes

As amostras foram analisadas para conteúdo de Fósforo extratável, Azoto amoniacal e Nitratos e Nitritos. A alíquota das amostras utilizada para a análise foi retirada da amostra colhida após homogeneização desta, para um frasco de vidro e posteriormente congelada. Após descongelação, as amostras foram tratadas com adição de 10 ml do extratante Bicarbonato de Sódio (no caso do Fósforo extratável) ou Cloreto de Potássio (no caso do Azoto Amoniacal e Nitrato+Nitrito) por grama de sedimento húmido. As amostras foram agitadas durante cerca de 30 min a 200 rpm de velocidade, e depois de um período de repouso, foi retirado o sobrenadante, que foi filtrado com filtros de policarbonato de diâmetro de poro de 0,4 µm devido à grande quantidade de matéria particulada em suspensão. No caso do Azoto amoniacal e Nitrato+Nitrito, foi ainda adicionado ao extrato 20 µl de uma solução de ácido sulfúrico, por cada 10 ml deste de forma a acidificá-lo antes da análise. A análise dos nutrientes é efetuada num Autoanalisador de Fluxo Segmentado SKALAR SAN^{plus} que é composto por um amostrador, módulo químico, sistema de detenção fotométrica contendo filtro de leitura de 880 nm, 630 nm e 540 nm para a leitura do composto formado para deteção de Fósforo extratável, Azoto amoniacal e Nitratos+Nitritos, respetivamente. Tem ainda um filtro de correção de 620 nm para Nitrato+Nitrito e 1010 nm para os restantes, e um sistema de aquisição e registo de dados. A quantificação é efetuada na seguinte sequencia: padrões de calibração, brancos, padrões de controlo, amostras e controlos internos do equipamento. Os cálculos são efetuados por o software do sistema que ajusta os resultados de forma a minimizar possíveis alterações devidas à variação das condições ambientais, qualidade dos reagentes ao longo da sequência de amostragem, caracterização errónea de picos, etc. Os resultados são apresentados em base seca.

- **Determinação de Fósforo extratável**

O método utilizado para a determinação de fósforo extratável baseia-se na formação de um complexo de antimónio, fósforo e molibdénio que é reduzido a outro complexo corado de cor azul (azul de molibdénio), segundo o método de Olsen (1953). Para isso adiciona-se à amostra heptamolibdato de amónio na presença de antimónio III, presente como ião antimoniltartarato, de forma a originar o complexo antimónio-fosforo-molibdato, que apresenta uma cor ligeiramente amarela. De seguida é adicionado ácido L(+)-ascórbico que reduz o complexo sob a ação catalisadora do ião antimoniltartarato, e este passa a apresentar uma cor azul intensa. O corante formado apresenta grande absorvidade molar

ao comprimento de onda de aproximadamente $3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A absorvância da solução é lida a 880 nm num percurso ótico de 50 mm, e corrigida pela leitura da absorvância a 1010 nm (comprimento de onda ao qual a absorvância do corante formado é mínima).

- **Determinação de Azoto Amoniacal**

O método utilizado para a determinação do azoto amoniacal baseia-se numa modificação da reação de Berthelot, em que um composto corado de verde se forma quando a amônia reage com hipoclorito e fenol. Primeiro dá-se a reação quantitativa dos compostos de amônia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) com hipoclorito havendo formação de uma cloroamina. No excesso de hipoclorito, a amina reage com o fenol para formar o composto azul de indofenol. O corante que é formado apresenta grande absorvância molar ao comprimento de onda de aproximadamente $2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A absorvância da solução é então lida a 630 nm num percurso ótico de 50 mm, e corrigida pela leitura da absorvância a 1010 nm (comprimento de onda ao qual a absorvância do corante formado é mínima).

- **Determinação do Nitrato + Nitrito**

O método utilizado para a determinação de nitrato e nitrito baseia-se na redução do nitrato presente na amostra a nitrito por contacto com cádmio coperizado e seguido de uma reação do nitrito com duas aminas aromáticas de modo a formar um composto azóico fortemente corado de cor purpura avermelhada. A reação começa por a passagem da amostra por uma coluna de vidro preenchida com cádmio granulado coperizado para acontecer a redução quantitativa do nitrato a nitrito. De seguida, adicionou-se à amostra uma solução de sulfanilamida e diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina. A reação do nitrito com a sulfanilamida forma quantitativamente um composto diazo que reage de imediato com o diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina formando o corante azóico. O corante que é formado apresenta grande absorvância molar ao comprimento de onda de aproximadamente $4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A absorvância da solução é então lida a 540 nm num percurso ótico de 50 mm, e corrigida pela leitura da absorvância a 620 nm (comprimento de onda ao qual a absorvância do corante formada é mínima).

2.3. Procedimentos Laboratoriais: Análise de macroinvertebrados bentónicos

Para análise das amostras biológicas, estas foram lavadas com água abundante por um crivo de $63 \mu\text{m}^1$ até retirar o formol e finos da amostra. Posteriormente os organismos observados em cada amostra foram triados e identificados à lupa com o auxílio de chaves de identificação específicas (Hayward e Ryland (1998) e Degraer *et al.*, (2006)). Foi também registada a abundância de cada *taxa* identificado. Na identificação de organismos que se apresentassem destruídos, o critério de contagem foi os que apresentavam a parte superior (cabeça). Relativamente aos bivalves e molusca o critério de descarte definiu-se como a ausência de habitante.

Os resultados da identificação e contagem dos organismos foram então analisados através do cálculo dos índices Shannon-Wiener index - $H'(\log_2)$ (Shannon e Weaver, 1963), Equatibilidade de Pielou (J') (Pielou, 1966) e AZTI's Marine Biotic Index – AMBI (Borja *et al.*, 2000). Os indicadores H' e J' , descritos na Tabela 3, fornecem medidas complementares de diversidade sendo que o indicador H' se foca na abundância proporcional das espécies na comunidade (Agência Portuguesa do Ambiente, 2016) e J' deriva do primeiro e permite representar a uniformidade da distribuição dos indivíduos entre as espécies existentes. Na Tabela 4 encontra-se uma classificação de estado ecológico de acordo com o índice Shannon-Wiener que foi utilizado para classificar os locais amostrados, de acordo com Chainho *et al.* (2007).

Tabela 3: Algoritmos dos índices de Shannon-Wiener e Equatibilidade de Pielou (*adaptado* de Shannon e Weaver, 1963, e Pielou, 1966).

	Fórmula	Observações
Shannon-Wiener	$H' = -\sum p_i \log_2 p_i$	$p_i = n_i/N$
		n_i – número de indivíduos da espécie i N – número total de indivíduos
Equatibilidade de Pielou	$J = H'/H_{\text{máx}}$	$H_{\text{máx}} = \ln(S)$ S – Número de espécies

¹ A Diretiva Quadro de Água refere que a malha utilizada para a separação destes organismos deveria ser de $500 \mu\text{m}$, no entanto neste estudo foi utilizado o material disponível com posterior atenção na triagem, como o descarte de organismos mais pequenos (ex: Nemátodos).

Tabela 4: Classificação de estado ecológico de acordo com o índice de Shannon-Wiener (*adaptado de Chainho et al., 2007*).

Estado ecológico	H'
Elevado	>4,0
Bom	3,0 – 4,0
Moderado	2,0 – 3,0
Pobre	1,0 – 2,0
Mau	0,0 – 1,0

O AMBI (Azti Marine Biotic Index) é um índice utilizado atualmente para avaliar a qualidade ecológica de ecossistemas marinhos, através da análise da comunidade macrobentónica, que se baseia na sensibilidade das espécies como indicador de perturbações no ecossistema, sendo as espécies divididas em cinco grupos de sensibilidade (Tabela 5) e calcula-se através da seguinte equação:

$$\text{AMBI} = [(0)(\%GI) + (1,5)(\%GII) + (3)(\%GIII) + (4,5)(\%GIV) + (6)(\%GV)] / 100$$

Tabela 5: Classificação e descrição da sensibilidade das espécies por grupos de acordo com o índice AMBI (*adaptado de Borja et al., 2000*).

Grupo I	Espécies muito sensíveis ao enriquecimento orgânico e presentes em condições não perturbadas (estado de referência). Incluem carnívoros especialistas e alguns poliquetas tubícolas que se alimentam de depósito.
Grupo II	Espécies indiferentes ao enriquecimento orgânico e que apresentam baixas densidades, com variações pouco significativas ao longo do tempo (de estado de referência a situações de desequilíbrio ligeiro). Incluem alimentadores de suspensão carnívoros menos seletivos e necrófagos.
Grupo III	Espécies tolerantes a um excessivo enriquecimento orgânico e que ocorrem em condições normais, mas cujas populações são estimuladas pelo aumento dos teores de matéria orgânica (situações de desequilíbrio ligeiro). Alimentadores de depósitos superficiais como tubícolas da família SPIONIDAE.
Grupo IV	Espécies oportunistas de 2ª ordem que proliferam em situações de desequilíbrio ligeiro a pronunciado. Principalmente poliquetas de tamanho pequeno: alimentadoras de depósito subsuperficial como da família CIRRATULIDAE.

Grupo V Espécies oportunistas de 1ª ordem que proliferam em situações de desequilíbrio pronunciado. Alimentadores de depósito que proliferam em sedimentos finos.

O resultado obtido do AMBI é traduzido na identificação do estado ecológico pela Tabela 6. Os resultados do AMBI foram efetuados pelo programa AZTI MARINE BIOTIC INDEX (AZTI, www.azti.es).

Tabela 6: Conversão do resultado de AMBI para o estado ecológico do local de amostragem (*adaptado de Borja et al., 2000*).

AMBI	Grupo dominante	Estado da comunidade bentónica	Nível de poluição	M-AMBI	Estado ecológico
0,0 < BC ≤ 0,2	I	Normal	Não poluído	M-AMBI ≥ 0,85	Elevado
0,2 < BC ≤ 1,2		Empobrecido			
1,2 < BC ≤ 3,3	III	Desequilibrado	Ligeiramente poluído	0,85 > M-AMBI ≥ 0,55	Bom
3,3 < BC ≤ 4,3	IV – V	Transição para poluído	Moderadamente poluído	0,55 > M-AMBI ≥ 0,39	Moderado
4,3 < BC ≤ 5,0		Poluído			
5,0 < BC ≤ 5,5	V	Transição para muito poluído	Fortemente poluído	0,39 > M-AMBI ≥ 0,20	Pobre
5,5 < BC ≤ 6,0		Fortemente poluído			
6,0 < BC ≤ 7,0	Azóico	Azóico	Extremamente poluído	0,20 > M-AMBI	Mau

2.4. Análise estatística

De forma a perceber a existência de relação entre os parâmetros bióticos (comunidade macrobentónica) e abióticos (parâmetros físicos e químicos determinados no sedimento) foi efetuada uma Análise de Correspondência Canónica (CCA) com as duas matrizes de parâmetros, no programa Past (v 4.03). Foram também calculados coeficientes de correlação de Pearson no Excel entre os parâmetros físicos e químicos e os índices biológicos. O método utilizado para verificar a significância destes coeficientes foi o t de Student bicaudal.

3. Resultados e Discussão

3.1. Parâmetros físico-químicos

As amostras de sedimentos recolhidos foram analisadas quanto à granulometria, e os resultados obtidos apresentam-se na Figura 6. Em Setembro, os sedimentos dos locais 1 e 5 classificaram-se como silte argiloso devido à alta composição de silte (local 1 - 56,1 %; local 5 - 47,6 %) e argila (local 1 - 42,5 %; local 5 - 33,8 %) registada nestes locais. O local 4 apresentou sedimentos mais grosseiros com elevada percentagem de areia (77,3 %), classificando-se como areia. Na amostragem de Fevereiro, os locais 4 e 5 classificam-se como areia siltosa devido a uma maior percentagem de areia (Local 4 – 61,9 %; Local 5 – 61,3 %) e silte (Local 4 – 19,7 %; Local 5 – 19,5%). No local 1 há um aumento na percentagem de areia (41,3 %) e diminuição na percentagem de silte e argila (33,3 % e 25,4 % respetivamente) classificando-se como areia, silte e argila.

A variação da composição granulométrica dos sedimentos pode ser explicada pelo escoamento, transporte e erosão de sedimentos entre as diferentes zonas do estuário. O aumento do fluxo de água doce nos meses de inverno, acarreta um maior transporte de sedimentos no estuário (Woodruff *et al.*, 2001), o que poderá explicar o aumento de areias mais grossas nas amostras dos locais 1 e 5 após o período de inverno. No entanto, devido à inexistência de replicação desta análise, não se poderá descartar a possibilidade de a diferença entre Setembro e Fevereiro poderá ser reflexo apenas da heterogeneidade dos sedimentos no Estuário do Sado.

Os resultados obtidos da percentagem em Carbono Orgânico Total (COT) e Carbono Inorgânico Total (CIT), estão representados na Figura 7. Os locais 1 e 5 apresentaram maior percentagem de COT em Setembro, enquanto em Fevereiro os valores de COT registados foram mais uniformes para os três locais de amostragem, mas mais baixos do que os registados em Setembro. É possível verificar que nas amostras com sedimentos mais finos (local 1 e 5) o nível de COT é mais elevado. Esta relação pode ser explicada pela influência do tamanho das partículas dos sedimentos na sua composição, já que quanto mais fino o sedimento maior a sua área superficial aumentando os locais de ligações catiónicas com a matéria orgânica e outros contaminantes (Simpson e Batley, 2016). COT e a percentagem de silte, e COT e a percentagem de argilas apresentam uma correlação positiva e significativa ($p \leq 0,05$) bastante elevada ($r=0,915$ COT em função de silte, e $r= 0,936$ COT

em função da argila), o que corrobora a relação entre a dimensão das partículas de sedimento e o teor em matéria orgânica (Tabela II-A de Anexos).

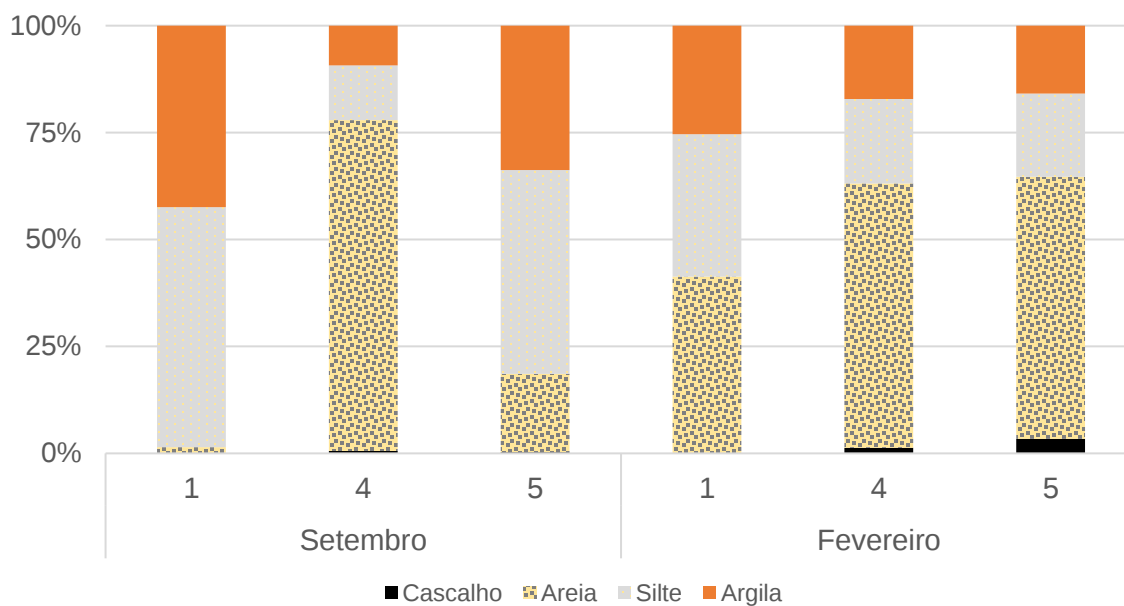


Figura 6: Percentagens dos diferentes componentes dos sedimentos recolhidos nas áreas amostradas no estuário do Sado para os meses de Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020.

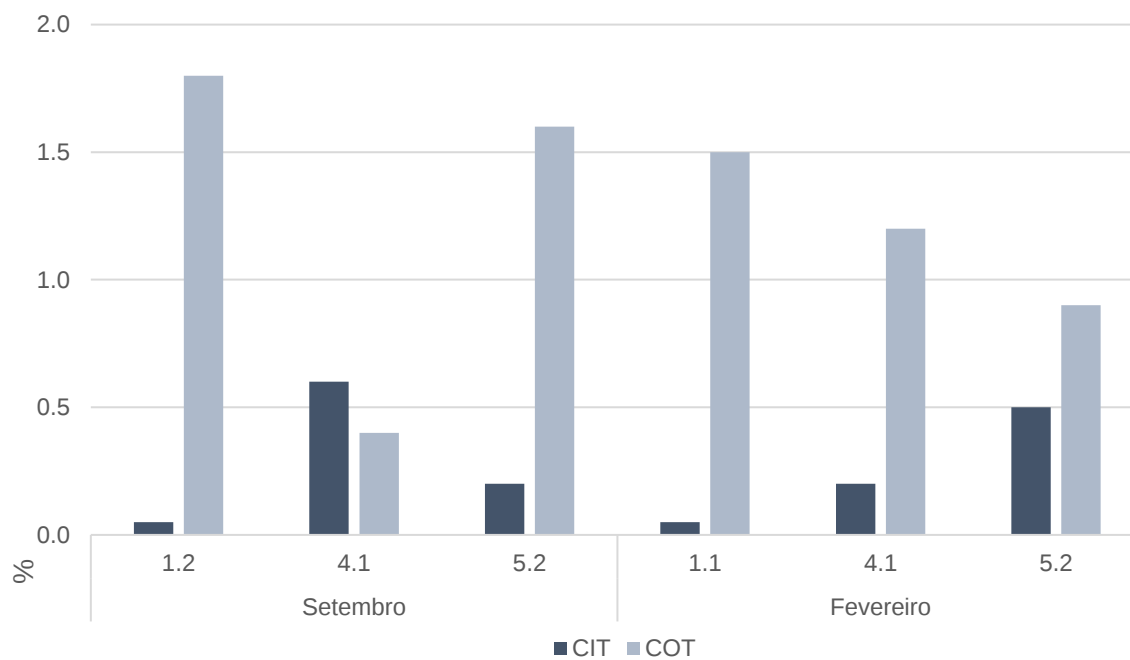


Figura 7: Resultados das percentagens de Carbono Orgânico Total (COT) e Carbono Inorgânico Total (CIT) determinadas nos sedimentos dos locais amostrados no estuário do Sado para os meses de Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020.

O aumento de COT no local 4 em Fevereiro, pode ser explicado pelo aumento do fluxo de entrada de água doce proveniente dos canais de Águas de Moura, já que estes sofrem grande enriquecimento orgânico proveniente dos campos de arroz na área envolvente ao estuário e da grande atividade de aquacultura praticada na região (Caeiro, 2004).

Num estudo de Mil-Homens *et al.* (2014) é possível verificar a heterogeneidade dos sedimentos do estuário do Sado onde se registou em vários pontos de amostragem diferentes quantidades de areia e argila. Lobo *et al.* (2017) também classificaram os sedimentos do estuário do Sado como arenosos a lodosos. Mil-Homens *et al.* (2014) compararam resultados obtidos em vários estuários portugueses, e foi possível visualizar que estuários mais homogêneos são compostos principalmente por areia, enquanto estuários mais semelhantes ao Sado (Ave, Leça, Tejo, Mira, Arade e Guadiana) apresentam percentagens variadas de argila/areia. Para além disso, estes estudos também demonstraram que o intervalo de valores da percentagem de Carbono orgânico quase não varia dentro no estuário: 0,2 – 2,0 % em Mil-Homens *et al.* (2014) e 1,30 – 2,05 % em por Lobo *et al.* (2017).

A concentração de nutrientes determinada nas amostras (Tabela 7) mostrou ser diferente entre os locais amostrados. Regra geral, o local 1 para o mês de Setembro apresentou valores mais elevados. No mês de Fevereiro, salienta-se o aumento na concentração de Azoto Amoniacal no local 4, enquanto que nos restantes locais se observou uma redução das concentrações dos restantes nutrientes analisados. A presença de Azoto Amoniacal pode relacionar-se com a quantidade de matéria orgânica, já que resulta da oxidação desta (Bragadeeswaran *et al.*, 2007). O coeficiente de correlação entre a percentagem de COT e a concentração de Azoto Amoniacal foi de $r = 0,623$ ($p \leq 0,05$), o que representa uma baixa mas significativa e positiva correlação linear (Tabela II-A de Anexos).

Os resultados obtidos para a concentração de nutrientes foram comparados com os do estudo de Mucha e Costa (1999), onde se verificaram valores mais baixos para todos os nutrientes exceto para o valor máximo de Fósforo (no estudo Fosfato) no inverno (Tabela III de anexos).

Tabela 7: Resultados das concentrações obtidas para os nutrientes (nitrato + nitrito, azoto amoniacal e fósforo extractável), e valores de pH para os sedimentos recolhidos nos locais amostrados no estuário do Sado para os meses de Setembro e Fevereiro.

Locais	Nitrato + Nitrito (mg-NO ₃ /kg)		Azoto Amoniacal (mg-NH ₃ /kg)		Fósforo Extractável (mg-P/kg)		pH (20-25°C)	
	Set19	Fev20	Set19	Fev20	Set19	Fev20	Set19	Fev20
1.1	11,0	15,8	80,0	14,9	130	7,0	7,6	8,2
1.2	300	8,4	65,0	11,0	130	14,4	7,7	8,4
1.3	15,0	4,0	90,0	8,3	140	5,4	7,6	8,5
4.1	5,0	4,9	10,0	24,4	19,0	10	8,3	8,1
4.2	4,0	4,8	12,0	12,3	18,0	6,8	8,5	8,5
4.3	-----	8,1	-----	59,0	-----	29,0	-----	8,2
5.1	6,0	8,4	55,0	37,5	70,0	18,1	8,2	8,5
5.2	4,0	5,0	23,0	36,1	90,0	13,8	7,9	8,4
5.3	5,0	4,7	59,0	20,9	160	9,1	7,7	8,5

O pH manteve-se constante, apresentando valores subalcalinos em ambos os meses (Sousa, 2006). A literatura associa valores de pH a diferentes substâncias: a valores de pH superiores a 7 o Fósforo reage com catiões de Cálcio formando Fosfato de Cálcio (Cerozi e Fitzsimmons, 2016); valores de pH = 8,5 parece ser o ideal para a nitrificação microbiana de Amónia para Nitritos e Nitratos (Cerozi e Fitzsimmons, 2016), e também aparenta ter um papel importante na especiação de metais (Simpson e Batley, 2016). Porém não se obtiveram coeficientes de correlação significativos entre o pH e os diversos contaminantes quantificados quer para os nutrientes quer para os metais (Tabela II-A de Anexos).

O resultado da análise de metais efetuada aos sedimentos do estuário do Sado apresenta-se na Tabela 8. De Setembro de 2019 para Fevereiro de 2020 há um aumento na concentração de metais no local de amostragem 4 e uma diminuição nos locais 1 e 5, com raras exceções. No entanto, o local 4 apresenta valores mais baixos que os outros locais em ambas as amostragens.

Relativamente ao local 5 os valores de Cu, Zn e Pb registados podem estar associados ao tipo de atividades realizadas no estaleiro naval, Zn é um metal utilizados nas tintas contra a corrosão, e Cu encontra-se em muitos materiais de construção, enquanto Pb é utilizado em tintas, pigmentos e vidro (Caeiro, 2004).

Tabela 8: Resultados da análise de metais para os sedimentos recolhidos no estuário do Sado nos meses de Setembro de 2019 e Fevereiro 2020 expressos em mg/kg exceto (*) Al e Fe cujos resultados estão expressos em g/kg.

		Cd (P)	Pb (P)	Ni (P)	Al* (T)	As (T)	Cu (T)	Cr (T)	Fe* (T)	Li (T)	Mn (T)	Hg	Zn (T)	
Setembro de 2020	1	1.1	<0,5	41	37	82	29	81	125	50	75	622	0,32	394
		1.2	<0,5	39	36	80	31	78	121	49	75	561	0,31	358
		1.3	<0,5	39	37	83	26	78	122	49	77	561	0,31	360
	4	4.1	<0,5	2	<7,5	20	3,6	5,0	9	3,4	11	38	0,20	27
		4.2	<0,5	3	<7,5	22	4,0	6,6	13	4,6	13	48	0,20	30
	5	5.1	0,6	161	25	50	41	551	93	44	56	326	0,42	839
		5.2	0,6	171	26	39	51	681	102	47	57	374	0,38	862
		5.3	<0,5	64	35	79	42	280	120	53	80	540	0,45	417
	Fevereiro de 2020	1	1.1	0,7	18	16	34	19	46	56	23	15	765	0,16
1.2			1,2	27	18	41	31	71	61	27	39	800	0,28	519
1.3			<0,5	5	<7,5	13	17	7,5	13	9,2	15	1510	0,02	167
4		4.1	<0,5	16	12	32	13	33	51	20	35	189	0,11	98
		4.2	<0,5	10	<7,5	26	7,7	19	30	11	25	97	0,06	60
		4.3	<0,5	29	26	39	28	65	96	42	64	384	0,24	195
5		5.1	<0,5	78	15	45	23	196	63	27	44	209	0,22	379
		5.2	<0,5	76	11	34	15	146	49	20	31	146	0,17	350
		5.3	<0,5	68	11	30	13	131	46	18	32	132	0,15	338

P – Digestão com ácido nítrico (parcial); T – digestão com ácido nítrico, clorídrico e fluorídrico (total)

A concentração dos metais analisados foi comparada com as concentrações de referência da OSPAR (Tabela 9). Os valores de referência das OSPAR correspondem a valores de áreas não contaminadas. Verifica-se que praticamente todos os metais avaliados excedem (a vermelho) os valores de referência para todos os locais amostrados nas duas campanhas de amostragem. Apenas no local 4 no mês de Setembro isso não se verifica, excedendo unicamente o valor de Hg e Cd. Para além disto, Ni nunca excede os valores OSPAR, e Cd apenas não excede em Setembro no local 1.

Por outro lado, a classificação dos sedimentos pode ser efetuada de acordo com a Portaria nº 1450/2007 que classifica materiais dragados de acordo com o grau de contaminação de metais (Tabela I de Anexos). Assim, os sedimentos recolhidos no local 1 classificam-se como ligeiramente contaminados (Classe 3) devido à concentração de Cr registada, o local 5 como muito contaminados (Classe 5) devido à concentração de Cu, e o local 4 como limpo (Classe 1). Para o último mês de amostragem podem classificar-se os sedimentos do local 1 e 4 como contaminação vestigial (Classe 2) devido à concentração

de As registada, Cu e Zn (no local 1) e Cu, Cr e Zn (no local 4), e os do local 5 como ligeiramente contaminados (Classe 3).

Tabela 9: Comparação da Classe 1 (material limpo) da Portaria nº 1450/2007 e dos valores de referência OSPAR, com os resultados obtidos no estuário do Sado e após normalização com Al, respetivamente. Resultados expressos em mg/kg.

		As	Cd	Pb	Cu	Cr	Hg	Ni	Zn
Port. nº 1450/2007 (Classe 1)		20	1	50	35	50	0,5	30	100
Set	1	26 - 31	<0,5	39 - 41	78 - 81	121 - 125	0,31 - 0,32	36 - 37	358 - 394
	4	4	<0,5	2 - 3	5 - 6	9 - 13	0,2	<8	27 - 30
	5	41-51	<0,5 - 0,6	64 - 171	280 - 551	93 - 120	0,38 - 0,45	25 - 35	417 - 862
Fev	1	17-31	<0,5 - 0,7	5 - 27	8 - 71	13 - 61	0,02 - 0,28	<8 - 18	167 - 519
	4	7,7- 28	<0,5	10 - 29	19 - 65	30 - 96	0,06 - 0,24	<8 - 26	60 - 195
	5	13 - 23	<0,6	68 - 78	131 - 196	46 - 63	0,15 - 0,22	11 - 15	338 - 379
OSPAR		15	0,20	25	20	60	0,05	45	90
Set	1	16 - 19	0,16	24 - 26	49 - 51	76	0,19 - 0,20	22 - 23	224 - 246
	4	9	0,57 - 0,63	11 - 13	13 - 15	23 - 30	0,45 - 0,50	9 - 10	68
	5	26 - 65	0,17- 0,77	40 - 219	175 - 873	75 - 131	0,28 - 0,49	22 - 33	260 - 1105
Fev	1	27 - 64	0,96 - 1,5	19 - 33	29 - 87	49 - 82	0,08 - 0,34	14 - 24	546 - 642
	4	17 - 35	0,32 - 0,54	23 - 37	40 - 84	65 - 123	0,14 - 0,31	8 - 33	130 - 250
	5	22 - 25	0,28 - 0,42	87 - 113	214 - 218	70 - 76	0,24 - 0,26	16 - 18	421 - 563

Nota: cor verde representa os valores abaixo dos valores de referência da OSPAR e da Classe 1 da Portaria de dragados; cor vermelha representa os valores que ultrapassam os valores de referência da OSPAR e da Classe 1 da Portaria de dragados.

Para além desta interpretação face à legislação em vigor, foi feita ainda uma comparação com os resultados obtidos por Valença *et al.* (2012) no estuário do Sado. Para isso, foram selecionados os resultados das estações mais próximas (Tabela IV de Anexos) dos locais de amostragem do presente estudo. Os resultados obtidos no presente estudo vêm corroborar os resultados de 2012. As concentrações de As, Cd, e principalmente Cu, Pb e Zn são muito superiores às obtidas em Mil-Homens *et al.* (2014). No entanto este estudo não abrange áreas próximas do local 5, que apresenta concentrações mais elevadas para estes elementos. O estudo permite ainda observar que o estuário do Sado é um dos estuários mais contaminados de Portugal para a maioria dos metais analisados, embora alguns estuários apresentem valores semelhantes para alguns metais. Por comparação

com os resultados de Mil-Homens *et al.* (2014) na Tabela V de anexos, observa-se que as concentrações de As registadas no presente estudo apresentam-se em valores mais elevados no Douro e Guadiana, Hg no estuário do Mira e na Ria de Aveiro, e Ni no Mira e Lima. Quanto à concentração de Cd, Cu, Pb e Zn, estes encontram-se acima dos valores máximos para todos os restantes estuários estudados.

A concentração de metais registada é preocupante tendo em conta os efeitos nocivos que estes metais podem ter nos organismos aquáticos. Para além disto, devido a fenómenos de bioacumulação e bioamplificação nas cadeias tróficas aquáticas, o consumo destes organismos pode causar efeitos nocivos no ser humano, representando um risco 40 vezes maior que pelo consumo de água contaminada (Barros *et al.*, 2010). As concentrações tão baixas como 0,01 mg L⁻¹, para metais como Cd, Zn, Cr, Cu, Pb e Hg, já foram observados efeitos nefastos a nível do sistema reprodutivo de várias espécies de peixes (Rodrigues *et al.*, 2019). Mais ainda, estes metais estão também descritos como tóxicos para diversas espécies de aves e peixes ao nível do sistema renal (Cd e Pb), nervoso (Pb e Hg), sanguíneo e imunitário (Pb). Níveis elevados de Zn demonstraram ainda ser um fator de morte de vários peixes quando a exposição ocorre por vários dias (Lins *et al.*, 2010).

A concentração de nutrientes e metais pesados parece variar como esperado, aumentando quando há um aumento da quantidade de sedimentos finos e matéria orgânica, e diminuindo quando o contrário ocorre. Os coeficientes de correlação entre a percentagem de COT, silte e argila, e a concentração de nutrientes e metais são, para a maioria dos nutrientes e metais, significativos ($p \leq 0,05$) e demonstram uma correlação positiva bastante elevada (Tabela II, A. de Anexos), o que comprova a relação entre estes parâmetros. Para além disto, deve-se ter em atenção que a presença de flutuações na concentração de metais e nutrientes entre as réplicas de cada local de amostragem (por exemplo: a concentração de Nitrato+Nitrito da réplica 2 do local 1) pode estar associado ao facto dos pontos amostrados em triplicado não terem exatamente as mesmas coordenadas, ou seja não foram colhidos exatamente no mesmo ponto, conforme indica a figura II de Anexos.

3.2. Macroinvertebrados bentónicos

Foram observadas 31 taxa em sedimentos do estuário do Sado amostrados em Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020 (Tabela VI e Tabela VII nos anexos). O grupo de invertebrados dominante nos locais amostrados foi a classe Polychaeta. No mês de Setembro, a espécie mais abundante no local 1 e 4 foi *Streblospio* sp. (Webster, 1879) (Figura 8 – A), organismo classificado por o índice AMBI como indiferente a enriquecimento orgânico e que apresenta baixas densidades (grupo III). Os organismos da família Cirratulidae (Ryckholt, 1851) (Figura 8 – B), do grupo AMBI IV, observaram-se com maior abundância no local 4. Em Fevereiro observa-se um aumento de diversidade, com um aumento de espécies e número de indivíduos. Os organismos mais abundantes, foram a Polychaeta *Cossura longocirrata* (Webster & Benedict, 1887) pertencentes ao grupo IV do AMBI (Figura 8 – C).

Os organismos bentónicos observados neste estudo são idênticos a alguns géneros e espécies identificadas por Carvalho *et al.* (2001), nomeadamente: *Spiochaetopterus* sp., *Melinna* sp., *Scoloplos* sp., *Ampelisca* sp. e *Corbula gibba*. Lobo *et al.* (2017) no estuário do Sado identificaram também espécies como *Cyathura carinata*, *Diopatra neapolitana* *Ampelisca* sp., um tipo de *Melinna* sp. e ainda a família Cirratulidae, organismos estes também observados nos locais estudados no presente estudo. Alguns dos taxa observados são referidos como abundantes também noutros estuários portugueses (Oligochaeta, Cirratulidae, *Polydora* sp. e uma espécie de *Streblospio* no estuário de Tagus) (Chainho *et al.*, 2007, 2010). Estes estudos referem ainda a espécie *Corophium* sp. que corresponde a um nome desatualizado, atualmente descrita como *Apocorophium* sp..

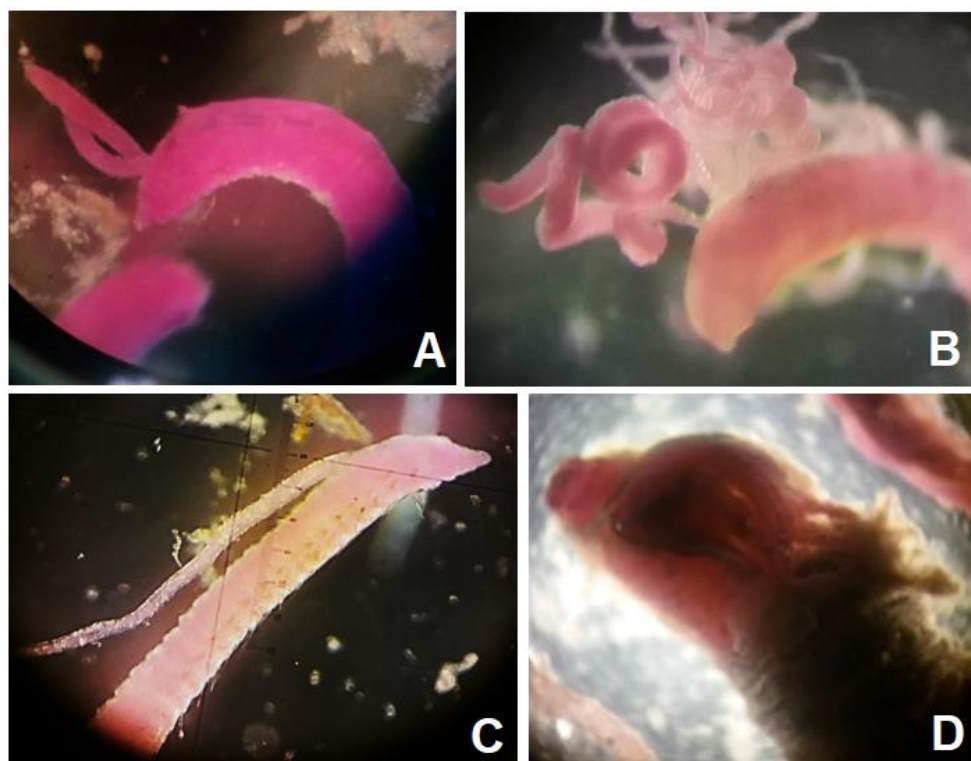


Figura 8: Fotografias de indivíduos observados nas amostras recolhidas no estuário do Sado. A – *Streblospio* sp. (Webster, 1879); B – CIRRATULIDAE (Ryckholt, 1851); C – *Cossura longocirrata* (Webster & Benedict, 1887); D – *Paramytha ossicola* (Queirós, Ravara, Eilertsen, Kongsrud & Hilário, 2017).

Na Tabela 10 pode ser observada a abundância e riqueza específica nos diferentes locais de amostragem, bem como os índices de equitabilidade de Pielou e de diversidade de Shannon-Wiener. Regra geral verifica-se um aumento na abundância e riqueza biológica de setembro para fevereiro. É de salientar o aumento na riqueza de espécies no local 5, e o aumento de abundância no local 4. Com a exceção do local 4, os índices de equitabilidade e diversidade demonstram um aumento de Setembro para Fevereiro, e de uma forma geral, o local 1 apresenta os valores mais baixos (dominância de algum *taxa*).

De acordo com a Tabela 4 (Chainho *et al.*, 2007) o índice de Shannon-Wiener confere os seguintes estatutos de qualidade ecológica para os locais amostrados: má a pobre para o local 1; moderada a pobre no local 4 (embora o declínio seja ligeiro); pobre a moderada (no limiar da boa qualidade) no local 5. Chainho *et al.*, 2007 relata, para o estuário do Mondego, uma diminuição da qualidade ecológica de acordo com o índice H' dos meses de verão/outono para o inverno, o que não se verificou no estuário do Sado. Em estudos anteriores ao estuário do Sado como Mucha e Costa (1999) é reportado um valor de J' um

pouco menor que o intervalo de valores obtido neste estudo (0,26 a 0,76), no entanto o índice H' comporta-se de forma semelhante ao presente, já que varia de 0,91 a 3,36. Num outro estudo, Amaral e Costa (1999), que aborda uma área mais pequena do estuário do Sado perto do local 4, registaram valores mais baixos de ambos os índices no outono e mais elevados na primavera/verão, o que corrobora a hipótese de o local 4 ter uma dinâmica diferente dos outros 2 locais.

Tabela 10: Resultados dos índices de abundância, riqueza, Equabilidade de Pielou (J') e de Shannon-Wiener (H') para cada local amostrado no estuário do Sado para os meses de Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020.

	Abundância		Riqueza		J'		H'		
Local	Set 19	Fev 20	Set 19	Fev 20	Set 19	Fev 19	Set 19	Fev 20	
1	1.1	98	146	3	8	0,40	0,78	0,44	1,62
	1.2	201	304	6	7	0,62	0,29	1,11	0,57
	1.3	123	72	3	6	1,01	1,01	1,11	1,80
	Total	422	522	6	10	-----	-----	-----	-----
4	4.1	167	2474	8	13	1,08	0,76	2,25	1,95
	4.2	485	140	12	11	0,92	0,95	2,27	2,27
	4.3	-----	1095	-----	11	-----	0,70	-----	1,68
	Total	652	3709	12	17	-----	-----	-----	-----
5	5.1	186	440	4	13	1,02	0,92	1,41	2,37
	5.2	5	366	3	21	1,39	0,97	1,52	2,96
	5.3	96	240	4	17	0,57	1,14	0,79	3,22
	Total	287	1046	6	22	-----	-----	-----	-----

Através da matriz de abundâncias dos macroinvertebrados bentónicos observados foi calculado o AZTI MARINE BIOTIC INDEX (Figura 9 e Figura 10). A Tabela 10 apresenta o resultado do AMBI, e a tradução de $M - AMBI$ para o estado ecológico para os locais e períodos de amostragem. No mês de Setembro nos locais 1 e 4 observa-se a dominância de taxa pertencentes ao grupo III (espécies que toleram ambientes ligeiramente perturbados), enquanto no local 5 são as taxa englobados no grupo IV (espécies que proliferam em ambientes moderadamente perturbados) os mais abundantes. Em Fevereiro no local 5 observa-se um aumento de espécies dos grupos I, II e III, traduzindo-se no melhoramento do estado ecológico (passando de moderado em setembro para elevado em fevereiro). Por outro lado, no local 4 registou-se um aumento de espécies do grupo IV e V que originou um decréscimo do estado ecológico de elevado para bom.

Este decréscimo de estado ecológico é um reflexo da perda de qualidade física e química observada neste local (SA4, aumento da concentração em metais pesados, nutrientes e da percentagem de matéria orgânica). Apesar de no local 1 se ter registado o aumento de espécies pertencentes ao grupo V, não houve alteração do estado ecológico permanecendo moderado. Note-se que a espécie *Paramytha ossicola* (Queirós *et al.*, 2017) (Figura 3.2.1 – D) observada em Setembro no local 4 e no local 5 em Fevereiro, não se enquadra em nenhum grupo AMBI. Lobo *et al.* (2017) determinou que o estuário do Sado se encontrava ligeiramente perturbado segundo o índice AMBI em 2012, um resultado diferente do obtido neste estudo, já que a maioria das réplicas se classificam como moderadamente perturbadas.

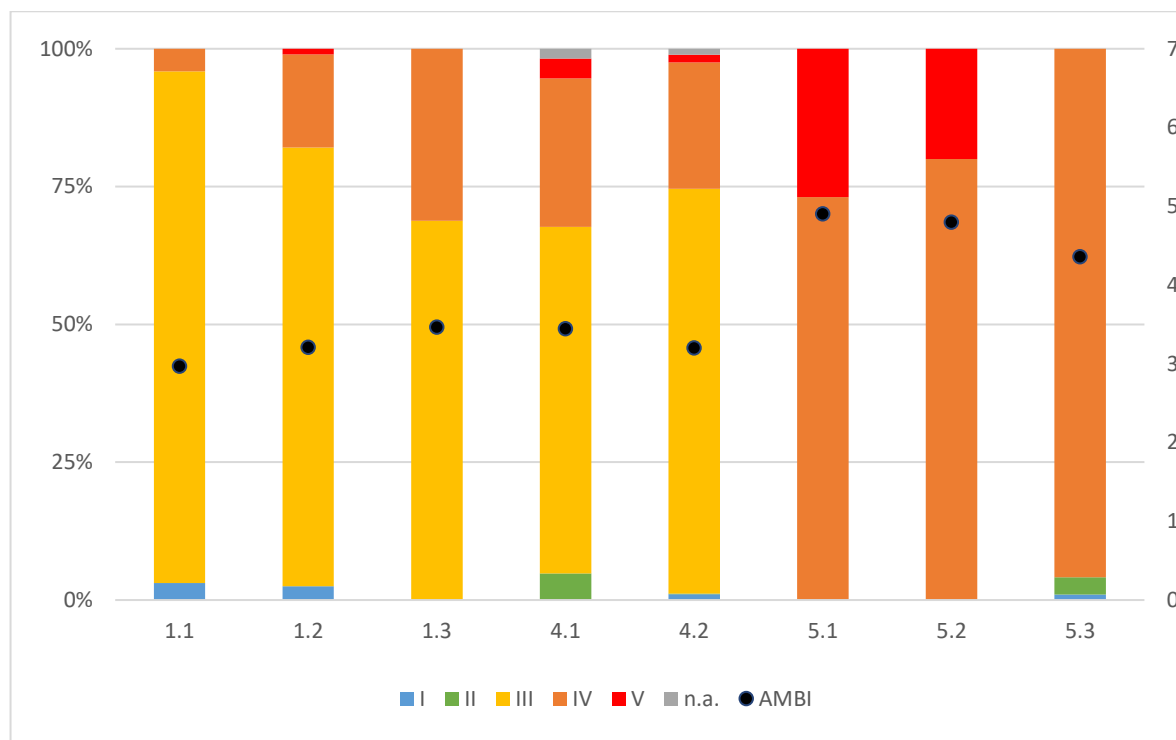


Figura 9: Histograma representativo dos grupos de espécies presentes em cada local amostrado no estuário do Sado no mês de Setembro de 2019, de acordo com o AMBI (*adaptado de AZTI MARINE BIOTIC INDEX*).

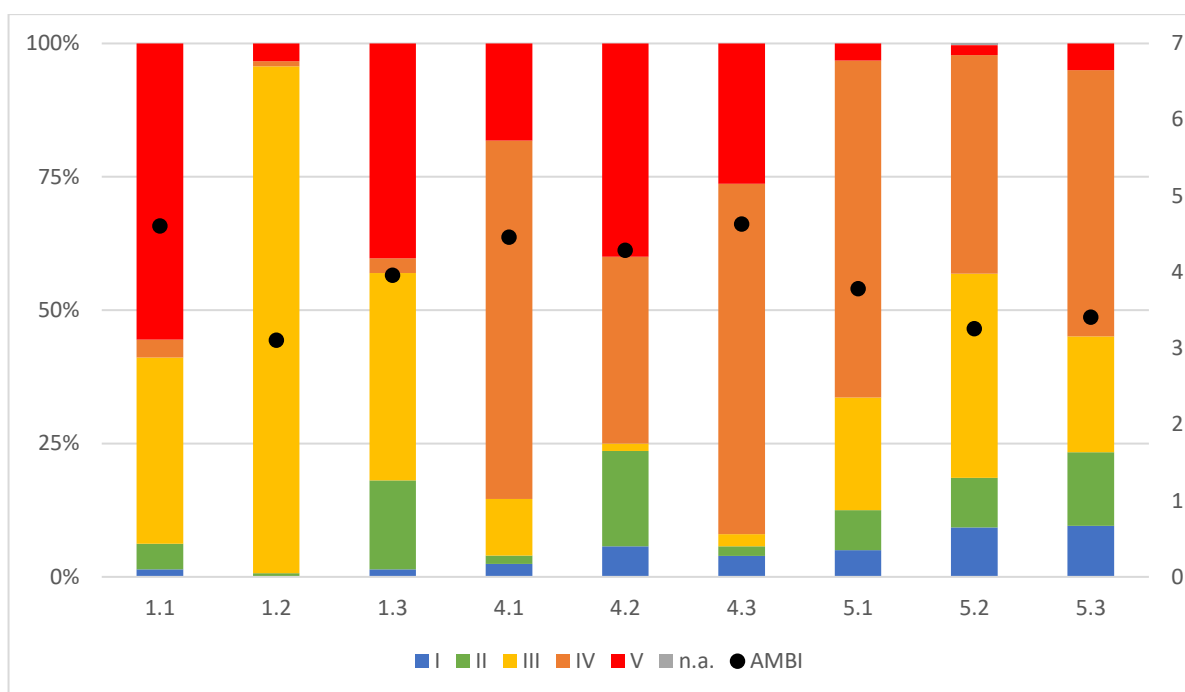


Figura 10: Histograma representativo dos grupos de espécies presentes em cada local amostrado no estuário do Sado no mês de Fevereiro de 2020, de acordo com o AMBI (*adaptado de AZTI MARINE BIOTIC INDEX*).

Tabela 11: Resultados dos cálculos do programa AZTI MARINE BIOTIC INDEX para as amostras recolhidas no estuário do Sado nos meses de Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020.

Local	AMBI		M-AMBI		Estado		
	Set 19	Fev20	Set 19	Fev 20	Set 19	Fev 20	
1	1.1	2,969	4,603	0,463	0,453	Moderado	Moderado
	1.2	3,209	3,104	0,625	0,496	Bom	Moderado
	1.3	3,468	3,958	0,508	0,510	Moderado	Moderado
4	4.1	3,448	4,458	0,827	0,587	Elevado	Bom
	4.2	3,203	4,286	0,977	0,605	Elevado	Bom
	4.3	----	4,629	----	0,507	----	Moderado
5	5.1	4,903	3,781	0,437	0,704	Moderado	Bom
	5.2	4,800	3,255	0,432	0,956	Moderado	Elevado
	5.3	4,359	3,406	0,402	0,900	Moderado	Elevado

No artigo de Chainho *et al.* (2007) é relatado um melhoramento do estado ecológico dos meses de verão/outono para os meses de inverno, situação também registada no presente estudo com a exceção do local 4.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram o facto de AMBI ser um bom indicador de poluição orgânica e nutrientes num sistema estuarino (Medeiros *et al.*, 2013).

Observe-se os resultados obtidos para o local 5, onde se registou a diminuição de matéria orgânica e nutrientes com o aumento do estado ecológico. Os parâmetros biológicos estudados apresentaram, quase todos, uma correlação positiva significativa ($p \leq 0,05$) com o pH e também com a composição sedimentar em CIT, COT e a nível da granulometria (Tabela II-B de Anexos), o que poderá significar que estes são os fatores ambientais (dos quais estudados) que mais influenciam as comunidades biológicas.

De modo a perceber a relação entre os parâmetros físicos e químicos e biológicos analisados nas amostras de sedimentos foi efetuada uma análise de correspondência canónica (Figura 11). Esta explica 89,2% da variabilidade relacional dos fatores abióticos e bióticos com dois eixos primários de ordenação, o eixo 1 (52,1%) e o eixo 2 (37,1%).

O local 1 associa-se de forma positiva com o eixo 1, e caracteriza-se, em Fevereiro, por conteúdos elevados de Nitratos e Nitritos e alguns metais como Cd e Al. Mais ainda, este local caracteriza-se pela ocorrência das espécies *Streblospio* sp., uma polychaeta que se alimenta de matéria orgânica depositada na superfície do sedimento e que por isso prolifera em ambientes organicamente enriquecidos (Borja *et al.* 2000), e Cirolanidae - um Isopoda pouco tolerante a poluição (Paiva, 2012) mas que foi encontrada apenas uma vez na amostragem.

O local 4 apresenta-se também associado ao eixo 1, em que o gradiente sazonal indica uma maior concentração de metais em fevereiro. Em Setembro, as espécies mais abundantes foram *Apocorophium lacustre*, *Cyathura catinata* (espécies do filo Crustacea), e as Polychaeta Cirratulidae, que se caracterizam por se alimentarem de matéria orgânica na superfície do sedimento (Guerra-García *et al.*, 2014; Pais-Costa *et al.*, 2015; Borja *et al.*, 2000). No mês de Fevereiro o local 4 associa-se a espécies pertencentes ao grupo III AMBI como a polychaeta *Cossura longocirrata* e o Crustacea *Pariambus* sp. que se alimentam de matéria orgânica em suspensão (Sivadas *et al.*, 2010; Guerra-García *et al.*, 2014), e ao mesmo tempo a espécies do grupo I como Sabellidae e *Diopatra neapolitana*, Polychaetas tubícolas (Glover *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2011) e o Crustacea Cumacea.

O local 5 apresenta-se distribuído ao longo do gradiente identificado pelo eixo 2. No mês de Setembro, é possível verificar uma grande semelhança com os resultados do local 4 em Fevereiro, apresentando-se com valores elevado dos mesmos metais e espécies. No mês de Fevereiro o local 5 apresenta maiores quantidades de areia e cascalho, e de conteúdo em carbono inorgânico. Este local evidencia-se ainda pelas espécies aí

observadas como *Spiochaetopterus* sp., *Melinna* sp., Terebellidae, *Notomastus latericeus* e *Polydora* sp., a maioria observada apenas neste local.

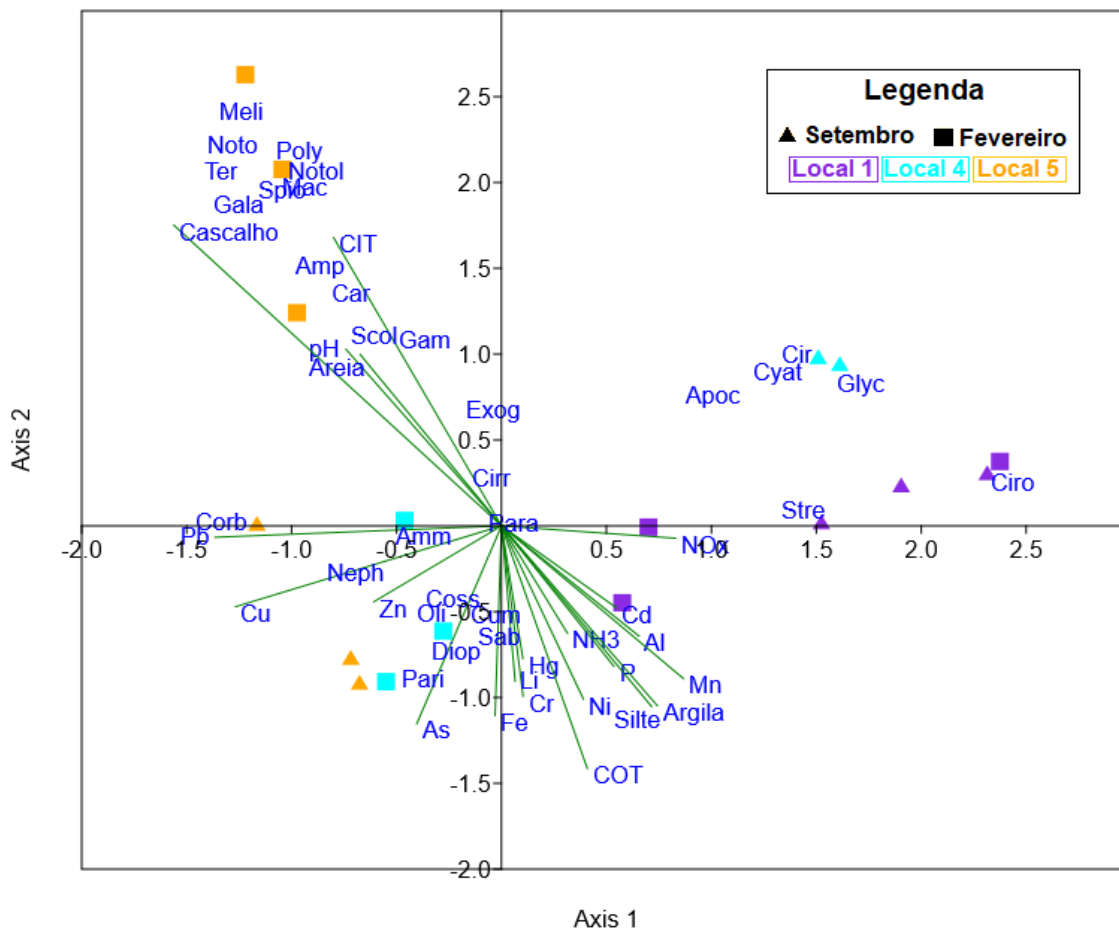


Figura 11: Análise de Correspondência Canônica para todos os parâmetros envolvidos na amostragem no estuário do Sado de Setembro de 2019 e Fevereiro de 2020.

4. Conclusão

Os sedimentos amostrados no estuário do Sado apresentam heterogeneidade na sua composição entre locais, e ainda variação sazonal, tal como já demonstrado em estudos anteriores (Amaral e Costa, 1999; Lobo *et al.*, 2017; Mil-Homens *et al.*, 2014; Mucha e Costa, 1999; Valença *et al.*, 2012).

As características e comportamento dos sedimentos dos locais 1 e 5 são semelhantes, apresentando uma maior composição de silte e argila, e de matéria orgânica, com maiores cargas de contaminantes que diminuem com a passagem de início de outono para finais de inverno. Pelo contrário, o local 4 apresenta uma maior composição em areia e uma maior quantidade de carbono inorgânico, com menores cargas de contaminantes que aumentam com a mudança das estações observadas. A biodiversidade e abundância da comunidade macrobentónica aumenta de Setembro de 2019 para Fevereiro de 2020 em todos os locais observados. Apesar disso, no local 4, provavelmente devido ao decréscimo da qualidade química registada, não se observou um aumento do índice ecológico AMBI (incremento de qualidade), devido à presença de espécies que proliferam em ambientes organicamente enriquecidos.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram uma classificação química dos sedimentos como limpos (Local 4), com contaminação ligeira (Local 1) e muito contaminados (Local 5) em Setembro, e com contaminação vestigial (Local 1 e 4) e contaminação ligeira (Local 5) em Fevereiro. No entanto, é de salientar as elevadas concentrações de alguns metais (Pb, Hg e Cu), já que a possibilidade de se tornarem biodisponíveis para a cadeia trófica é preocupante. A classificação biológica no mês de Setembro qualificou o estado ecológico como moderado (Local 1 e 5) e elevado (Local 4), e no mês de Fevereiro como bom (Local 1), moderado (Local 4) e elevado (Local 5). Relativamente à concentração de nutrientes, a variação mais significativa ocorreu no local 1 com valores mais elevados em Setembro que diminuem em Fevereiro. Nas restantes estações a variação não é significativa. Comparativamente com outros estudos pode considerar-se que as concentrações obtidas são elevadas (Mucha e Costa, 1999).

Para trabalhos futuros propõe-se o desenvolvimento de estudos envolvendo mais locais de amostragem ao longo do estuário e também nos canais afluentes, com um período de campanhas mais extenso. Só com uma abordagem mais complexa e longa será possível produzir resultados que caracterizem o estuário e o comportamento dos sedimentos, bem

como perceber a variação temporal dos parâmetros abióticos. Também se considera essencial e complementar, estudos que envolvam a articulação da avaliação de mais parâmetros físicos e químicos (p.ex.: compostos orgânicos) e biológicos (outros bioindicadores).

Este estudo permitiu ainda questionar sobre a adequabilidade do plano de monitorização de macroinvertebrados bentónicos proposto pela Diretiva Quadro de Água (Agência Portuguesa do Ambiente, 2009). A DQA indica que a amostragem de monitorização de macroinvertebrados bentónicos nos estuários deverá ser feita de 3 em 3 anos, com apenas um período de amostragens no verão de forma a evitar influências negativas das condições meteorológicas inverniais. Com os resultados obtidos neste estudo pode concluir-se que a abordagem da DQA será insuficiente para perceber o padrão das comunidades macrobentónicas estuarinas. Principalmente porque se verificou um aumento da comunidade de macroinvertebrados bentónicos do final de verão para o inverno, concluindo-se assim que apenas uma amostragem anual, pode representar uma taxa de erro elevada no momento da avaliação ecológica de uma massa de água de transição.

5. Bibliografia

- Agência Portuguesa do Ambiente (2020a) Águas costeiras e de transição. Acedido a 29 de Janeiro de 2020 em: <https://apambiente.pt/>
- Agência Portuguesa do Ambiente (2019a) Região Hidrográfica do Sado e Mira (RH6) Avaliação intercalar da implementação das medidas em Plano de Gestão de Região Hidrográfica. Acedido a 4 de Setembro de 2020 em: <https://apambiente.pt>
- Agência Portuguesa do Ambiente (2019b) Classificação das massas de água: avaliação intercalar 2014 – 2017. Acedido a 4 de Setembro de 2020 em: <https://apambiente.pt>
- Agência Portuguesa do Ambiente (2016) Região Hidrográfica do Sado e Mira (RH6) Anexos da Parte 2 - caracterização e diagnóstico em Plano de Gestão de Região Hidrográfica. Acedido a 12 de Fevereiro de 2020 em: <https://apambiente.pt>
- Agência Portuguesa do Ambiente (2009)
- Amaral, M. J. e Costa, M. H. (1999) Macrobenthic communities of salt pans from the Sado estuary (Portugal) *Acta Oecologica* **20**: 327–332
- Aquasado: Promover a Aquacultura Sustentável no Estuário do Sado (2020). O projeto AQUASADO. Acedido a 19 de Setembro de 2020 em: <https://aquasado.pt/project/>
- Barros, B. C. V.; Pereira, S. F. P.; Palheta, D. C. e Silva, C. S. (2010) Determinação de Cd, Cr e Al em tecido de peixes provenientes do rio Gelado/Apa, Floresta de Carajás-PA. *HOLOS Environment*, **10**: 195
- Bragadeeswaran, S.; Rajasegar, M.; Srinivasan, M. e Rajan, U. K. (2007) Sediment texture and nutrientes of Arasalar estuary, Karaikkal, south-east coast of India. *Journal of Enviromental Biology* **28(2)**: 237 – 240.
- Borja, A.; Franco, J. e Pérez, V. (2000) A marine biotic index to establish the ecological quality of soft bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* **40(12)**: 1100 – 1114.
- Cabral, S.; Carvalho, F.; Gaspar, M; Ramajal, J.; Sá, E.; Santos, C.; Silva, G.; Sousa, A.; Costa, O. L. e Chainho, P. (2020) Non indigenous species in soft-sediments: Are some estuaries more invaded than others? *Ecological Indicators* **110**.

- Cabrita, M. T.; Brito, P.; Caçador, I. e Duarte, B. (2020) Impacts of phytoplankton blooms on trace metal recycling and bioavailability during dredging events in the Sado estuary (Portugal). *Marine Environmental Research* **153**.
- Caeiro, S. S. F. S. (2004) Environmental data management in the Sado estuary: Weight of evidence to assess sediment quality. PhD. Thesis in Environmental Engineering. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa – Campus da Caparica, Monte da Caparica.
- Caeiro, S.; Costa, M. H.; Ramos, T. B.; Fernandes, F.; Silveira, N.; Coimbra, A.; Medeiros, G. e Painho, M. (2005) Assessing heavy metal contamination in Sado estuary sediment: An index analysis approach. *Ecological Indicators* **5**: 151 – 169.
- Carvalho, S.; Ravara, A.; Quintino, V. e Rodrigues, A. M. (2001) Macrobenthic community characterisation of an estuary from the western coast of Portugal (Sado estuary) prior to dredging operations. *Boletim - Instituto Espanol de Oceanografia* **17**: 179 – 190.
- Cerozi, B. S. e Fitzsimmons, K. (2016) The effect of pH on phosphorus availability and speciation in an aquaponics nutrient solution. *Bioresource Technology* **219**: 778 – 781.
- Chainho, P.; Costa, J. L.; Chaves, M. L.; Dauer, D. M. e Costa, M. J. (2007) Influence of seasonal variability in benthic invertebrate community structure on the use of biotic indices to assess the ecological status of a Portuguese estuary. *Marine Pollution Bulletin* **54**: 1586 – 1597.
- Chainho, P.; Silva, G.; Lane, M. F.; Costa, J. L.; Pereira, T.; Azeda, C.; Almeida, P. R.; Metelo, I. e Costa, M. J. (2010) Long term trends in intertidal and subtidal Benthic communities in response to water quality improvement measures. *Estuaries and Coasts* **33**: 1314 – 1326.
- Costa, P. M; Lobo, J.; Caeiro, S.; Martins, M.; Ferreira, A. M.; Cateano, M.; Vale, C.; Delvalls, T. A. e Costa, M. H.. (2008) Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research* **654**: 29 – 37.
- Covich, A. P.; Palmer, M. A. e Crowl, T. A.. (1999) The Role of Benthic Invertebrate Species in Freshwater Ecosystems: Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *Bioscience* **49**: 119–127.

Day Jr, J. W.; Yáñez – Arancibia, A.; Kemp, W. M. e Crump, B. C. (2012) *Estuarine Ecology*. 1º capítulo. 2ª edição, Willey-Blackwell.

Dauer, D. M. (1993) Biological criteria, environmental health and estuarine macrobenthic community structure. *Marine Pollution Bulletin* **26**: 249 - 257.

Decisão 85/338/EEC de 27 de Junho. Decisão do Conselho na adoção do programa de trabalho da Comissão relativa a um projeto experimental para recolha, coordenação e garantia na consistência de informação do estado do ambiente e dos recursos naturais na Comunidade. Jornal Oficial da União Europeia nº L 176: 14 – 17.

Decisão 90/150/CEE de 22 de Março. Decisão do Conselho que altera a Decisão 85/338/CEE relativa à adoção do programa de trabalho da Comissão respeitante a um projeto experimental para a recolha, a coordenação e a harmonização da informação sobre o estado do ambiente e dos recursos naturais na Comunidade. Jornal Oficial da União Europeia nº L 81/38.

Decreto-lei 430/80 de 1 de Outubro. Diário da República nº 227/1980, Série I. Presidência do Conselho de Ministros. Lisboa.

Decreto-Lei nº 140/99 de 24 de Abril. Diário da República nº 96/1999, Série I-A. Ministério do Ambiente. Lisboa.

Decreto-Lei nº 49/2005 de 24 de Fevereiro. Diário da República nº 39/2005, Série I-A. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.

Decreto-Lei nº 103/2010 de 24 de setembro. Diário da República nº 187/2010 – I Série. Ministério do Ambiente e do Ordenamento e do Território. Lisboa
Decreto-Lei nº 108/2010 de 13 de Outubro. Diário da República nº 199/2010, Série I. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.

Decreto-Lei nº 218/2015 de 7 de outubro. Diário da República nº 196/2015 – Série I. Ministério do Ambiente Ordenamento do Território e Energia. Lisboa.

Decreto-Lei nº 42/2016 de 1 de Agosto. Diário da República nº 146/2016, Série I. Ambiente. Lisboa.

Degraer, S.; Wittoeck, J.; Appeltans, W.; Cooreman, K.; Deprez, T.; Hillewaert, H.; Hostens, K.; Mees, J.; Berghe, E. V. e Vincx, M.. (2006) *The macrobenthos atlas of the Belgian part of the North Sea*. 1ª edição, Belgian Science Policy.

- Directiva 79/409/CEE de 2 de Abril de 1979. Diretiva do Conselho relativa à conservação das aves selvagens. Jornal Oficial nº L 103: 1 – 18.
- Diretiva 92/43/CEE de 21 de Maio de 1992. Diretiva do Conselho relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens. Jornal Oficial da União Europeia nº L 206/7.
- Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000. Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. Jornal Oficial da União Europeia nº L 327: 1 – 73.
- Diretiva 2008/56/CE de 17 de Julho de 2008. Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política para o meio marinho (Directiva-Quadro «Estratégia Marinha»). Jornal Oficial da União Europeia nº L 164/19.
- Diretiva 2009/147/CE de 30 de Novembro de 2009. Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à conservação das aves selvagens. Jornal Oficial da União Europeia nº L 20/7.
- Diretiva (UE) 2017/845 de 17 de maio de 2017. Diretiva da Comissão Europeia que altera a Diretiva 2008/56/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita à lista indicativa de elementos a ter em conta na elaboração das estratégias marinhas. Jornal Oficial da União Europeia nº L 125/27.
- Fairbridge, R.W.. (1980) The estuary: its definition and geodynamic cycle. Em: E. Olausson e I. Cato (eds.) *Chemistry and Biochemistry of Estuaries*. John Wiley and Sons. New York.
- Garcês, J. e Costa, M. H.. (2009). Trace metals in populations of *Marphysa sanguinea* (Montagui, 1815) from Sado estuary: effect of body size on accumulation. *Scientia Marina* **73**: 605 – 616
- Glover, A. G.; Gooday, A. J. ; Bailey, D. M.; Billett, D. S. M.; Chevaldonné, P.; Colaço, A.; Copley, J.; Cuvelier, D.; Desbruyères, D.; Kalogeropoulou, V.; Klages, M.; Lampadariou, N.; Lejeusne, C.; Mestre, N. C.; Paterson, G. L. J.; Perez, T.; Ruhl, H.; Sarrazin, J.; Soltwedel, T.; Soto, E. H.; Thatje, S.; Tselepides, A.; Van Gaever, S. e Vanreusel, A. (2010) Chapter One - Temporal Change in Deep-Sea Benthic Ecosystems: A Review of the Evidence From Recent Time-Series Studies. *Advances in Marine Biology*, **58**: 1-95

- Gonçalves, C.; Brogueira, M. J. e Nogueira, M.. (2015) Tidal and spacial variability of nitrous oxide (N₂O) in Sado estuary (Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **167**: 466-474
- Guerra-García, J. M.; Figueiroa, J. T.; Navarro-Barranco, C.; Ros, M.; Sánchez-Moyano, J. E. e Moreira, J. (2014) Dietary analysis of the marine Amphipoda (Crustacea: Peracarida) from the Iberian Peninsula. *Journal of Sea Research*, **85**: 508 – 517.
- Hayward, P. J. e Ryland, J. S. (1998) *Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe*. 3ª edição, Oxford University Press Inc.. Nova Iorque.
- INAG - Instituto da Água (2000). Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Sado. 1ª Fase – Análise e Diagnóstico da Situação actual.
- Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (2020a) Plano Sectorial da Rede Natura 2000: Sítios. Acedido a 5 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnes/class-carac>
- Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (2020b) Reserva Natural do Estuário do Sado: Informação. Acedido a 5 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnes/class-carac>
- Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (2020c) Plano Sectorial da Rede Natura 2000: Zonas de Proteção Especial. Acedido a 5 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnes/class-carac>
- Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (2020d) Plano Sectorial da Rede Natura 2000: fauna, mamíferos. Acedido a 5 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/pn/biodiversidade/rn2000/resource/doc/rn-plan-set/mamif/lutra-lutra/view>
- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2012a) Caracterização/Classificação. Acedido a 6 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnes/class-carac>
- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2012b) Em que consistem. Acedido a 5 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/pn/biodiversidade/rn2000/dir-ave-habit/dir-q-sao#av>
- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2012c) Convenção de Ramsar. Acedido a 5 de Maio de 2020 em: <http://www2.icnf.pt/portal/pn/biodiversidade/ei/ramsar>

- Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro. Diário da República n.º 249/2005 – I Série-A. Assembleia da República. Lisboa.
- Lillebø, A. I.; Coelho, P. J.; Válega, M.; Margalho, R.; Reis, M.; Raposo, J.; Pereira, F.; Duarte, A. C. e Pardal, M. A. (2011) Assessment of Mercury in water, sediments and biota of a southern European estuary (Sado estuary, Portugal). *Water, Air, & Soil Pollution* **214**: 667 – 680.
- Lins, J. A. P. N.; Kirschnik, P. G.; Queiroz, V. S. e Cirio, S. M. (2010) Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, **8**: 4.
- Lobo, J.; Shokralla, S.; Costa, M. H.; Hajibabae, M. e Costa, F. O. (2017) DNA metabarcoding for high-throughput monitoring of estuarine microbenthic communities. *Scientific Reports* **7**: 15618
- Margalef, R. (1968) *Perspectives in Ecological Theory*. 2ª edição, University of Chicago Press. Chicago.
- Medeiros, J.; Chainho, P.; Costa, J. L.; Azeda, C.; Sá, E.; Silva, G.; Chaves, M. L.; Marques, J. C.; Stein, E. D.; Layton, B.; Weisberg, S. B. e Costa, M. J. (2013) Zonas de salinidade e índices bióticos: DNA barcoding – uma nova ferramenta de monitorização ou uma ferramenta complementar? *VIII Congresso Ibérico sobre Planeamento e Gestão da Água. Science and Technology* **11**: 53 – 62.
- Mil-Homens, M.; Vale, C.; Raimundo, J.; Pereira, P.; Brito, P. e Caetano, M. (2014) Major factors influencing the elemental composition of surface estuarine sediments: The case of 15 estuaries in Portugal. *Marine Pollution Bulletin* **84**: 135 – 146.
- Mohamed, K. J.; Andrade, A.; Rey, D.; Rubio, B. e Bernabeu, A. M.. (2017) kinetic model to explain the grain size and organic matter content dependence of magnetic susceptibility in transitional marine environments: A case study in Ria de Muros (NW Iberia). *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **18**: 2200-2215
- Mucha, A. P. e Costa, M. H. (1999) Macrozoobenthic community structure in two Portuguese estuaries: Relationship with organic enrichment and nutrient gradients. *Acta Oecologica*, **20**: 363–376
- Oliveira, M.; Sales-Luis, T.; Duarte, A.; Nunes, S. F.; Carneiro, C.; Tenreiro, T.; Tenreiro, R.; Santos-Reis, M.; Tavares, L. e Villa, C. C.. (2008) First assessment of microbial diversity

- in faecal microfauna of Euroasian otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Portugal. *European Journal of Wildlife Research* **54**: 245-252.
- Olsen, S. R. (1953) Inorganic phosphorus in alkaline and calcareous soils. Em W. H. Pierre, e A. G. Norman (eds.) *Soil and fertilizer phosphorus in crop nutrition*. Academic Press, New York.
- OSPAR commission. (2014) Levels and trends in marine contaminants and their biological effects – CEMP Assessment Report 2013. Monitoring and Assessment Series.
- Pais-Costa, A. J.; Acevedo, P.; Marques, J. C. e Martinez-Haro, M. (2015) Addressing the recovery of feeding rates in post-exposure feeding bioassays: *Cyathura carinata* as a case study. *Environmental Research*, **137**: 222 – 225.
- Paiva, R. J. C. (2012) Família Cirolanidae Dana, 1852 (Crustacea, Isopoda) do norte e nordeste do Brasil. Tese de Mestrado em Oceanografia. Universidade Federal de Pernambuco – Recife.
- Palma, C. M. e Valença, M. (2006) Método de análise de metais em sedimentos marinhos ou estuarinos e seu desempenho. *Anais do Instituto Hidrográfico* **18**.
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**: 131 – 144.
- Pires, A.; Gentil, F.; Quintino, V. e Rodrigues, A. M. (2012) Reproductive biology of *Diopatra neapolitana* (Annelida, Onuphidae), an exploited natural resource in Ria de Aveiro (Northwestern Portugal). *Marine Ecology* **33**: 56–65.
- Portaria n.º 1450/2007 de 12 de Novembro de 2007. Diário da República n.º 217/2007, Série I. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.
- Psuty, N. P. e Moreira, M. E. (2000) Holocene sedimentation and sea level rise in the Sado estuary, Portugal. *Journal of coastal research* **16**: 125 – 138.
- Ribeiro, C.; Pardal, M. A.; Tiritan, M. E.; Rocha, E.; Margalho, R. M. e Rocha, M. J. (2009) Spatial distribution and quantification of endocrine-disrupting chemicals in Sado river estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment* **159**: 415 – 427.
- Rodrigues, G. Z. P.; Machado, A. B.; Gehlen, G. (2019) Influência de metais no comportamento reprodutivo de peixes, revisão bibliográfica. *Revista GEAMA*, **5**: 4 – 13.

- Rumohr, H. (2009) Soft-bottom macrofauna: collection, treatment and quality assurance of samples. *ICES techniques in marine environmental sciences* **43**.
- Salomons, W. (1985) Sediments and water quality. *Environmental Technology letters* **6**: 315 – 326
- Schelske, C. L. e Odum, E. P.. (1962) Mechanisms maintaining high productivity in Georgia estuaries. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* **14**: 75–80.
- Sequeira, M.; Matias, S.; Farinha, J.C.; Gaspar, R.; Silva, C.; Augusto, J.; Ferreira, C.V.; Fonseca, M.J.; Narra, P. e Luís, A.R. (2009) Bases para o plano de ação para a salvaguarda e monitorização da população de roazes do estuário do Sado. *Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade*.
- Shannon, C.E. e Weaver, W.W. (1963) *The mathematical theory of communications*. University of Illinois Press. Urbana.
- Silvadas, S.; Ingole, B. e Narajkar, M. (2010) Benthic polychaetes as good indicators of anthropogenic impact. *Indian Journal of Marine Sciences*, **39**: 201 – 211.
- Simpson, S. e Batley, G. (2016) *Sediment Quality Assessment: A Practical guide*. 2ª edição, CSIRO Publishing. Australia.
- Sousa, M. J. F. (2006) Contribuição para a caracterização geoambiental dos sapais do estuário do Sado – Aplicação experimental no ensino da geologia. Mestre. Tese em Geologia para o ensino. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa – Campus da Caparica, Monte da Caparica.
- Teixeira, H.; Neto, J. M. e Patrício, J. (2009) Quality assessment of benthic macroinvertebrates under the scope of WFD using BAT, the Benthic Assessment Tool. *Marine Pollution Bulletin* **58**: 1477 – 1486.
- Valença, M.; Gama, A.; Oliveira, A. E Palma, C. (2012) Metais em sedimentos – 25 anos de monitorização nos estuários do Tejo e Sado e nas rias de Aveiro e Formosa (1985 – 2009). 2ª Jornadas de Engenharia Hidrográfica. Lisboa, 20-22 de Julho de 2012.
- Wolanski, E. e Elliot, M. (2015) *Estuarine Ecohydrology*. 2ª edição, Elsevier Science.
- Woodruff, J. D.; Geyer, W. R.; Sommerfield, C. K.; Driscoll, N. W. (2001) Seasonal variation of sediment deposition in the Hudson River estuary. *Marine Geology* **179**: 105 – 119.

6. Anexos

Tabela 1.: Classificação de materiais dragados de acordo com o grau de contaminação de metais em mg/kg (*Adaptado da Tabela 2 do Anexo III da Portaria nº 1450/2007 de 12 de Novembro*).

Metais (mg/Kg)	Classe 1 (limpo)	Classe 2 (contaminação vestigial)	Classe 3 (ligeiramente contaminado)	Classe 4 (contaminado)	Classe 5 (muito contaminado)
Arsénio	<20	20 – 50	50 – 100	100 – 500	>500
Cádmio	<1	1 – 3	3 – 5	5 – 10	>10
Crómio	<50	50 – 100	100 – 400	400 – 1000	>1000
Cobre	<35	35 – 150	150 – 300	300 – 500	>500
Mercúrio	<0,5	0,5 – 1,5	1,5 – 3,0	3,0 – 10	>10
Chumbo	<50	50 – 150	150 – 500	500 – 1000	>1000
Níquel	<30	30 – 75	75 – 125	125 – 250	>250
Zinco	<100	100 – 600	600 – 1500	1500 – 5000	>5000

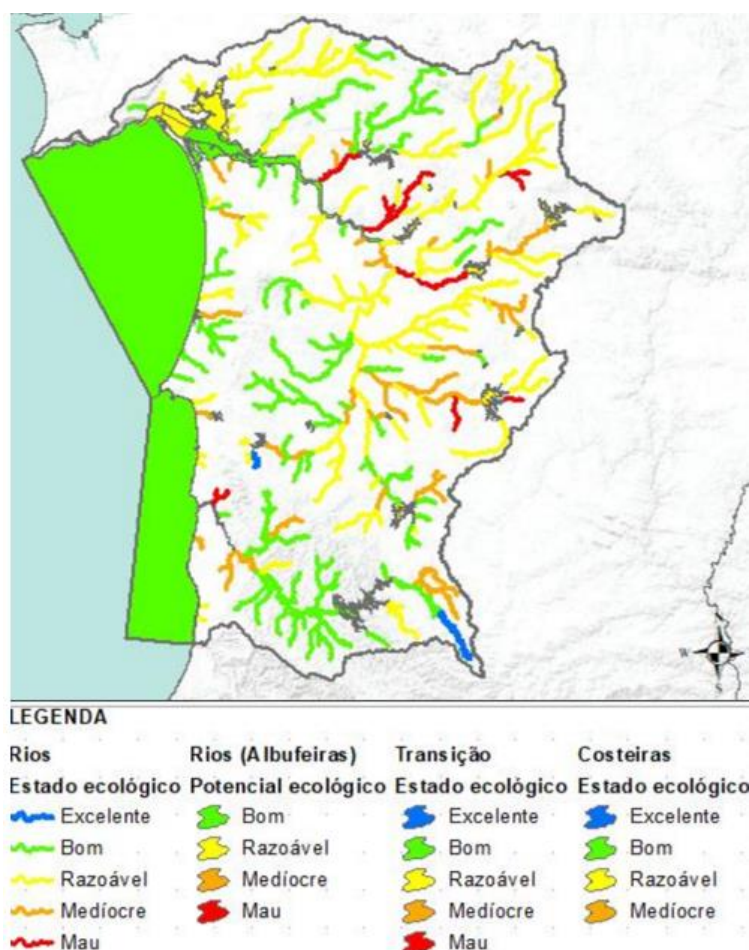


Figura 1.: Qualidade Ecológica da Região Hidrográfica do Sado e Mira (*Adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2019b*).



Figura II: Imagens satélite dos locais amostrados com os pontos das réplicas. Pins vermelhos – Setembro; Pins amarelos – Fevereiro.

Tabela II.: Coeficientes de correlação e respectivo t de student calculado, para os parâmetros físico-químicos e biológicos: A) entre características do sedimento com a concentração de contaminantes; B) entre índices biológicos e os parâmetros físico químicos.

A)	pH		CIT		COT		Cascalho		Areia		Silte		Argila	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Cd	0,34	0,17	-0,23	0,35	0,40	0,10	-0,25	0,32	-0,02	0,95	0,29	0,24	0,28	0,26
Pb	0,20	0,43	0,08	0,74	0,36	0,14	0,16	0,52	-0,27	0,27	0,44	0,06	0,41	0,10
Ni	0,19	0,44	-0,42	0,08	0,79	≤0,05	-0,29	0,24	-0,64	≤0,05	0,87	≤0,05	0,83	≤0,05
Al	0,28	0,26	-0,29	0,24	0,75	≤0,05	-0,20	0,42	-0,56	≤0,05	0,85	≤0,05	0,86	≤0,05
As	0,29	0,25	-0,35	0,16	0,77	≤0,05	-0,25	0,31	-0,51	≤0,05	0,79	≤0,05	0,77	≤0,05
Cu	0,14	0,58	-0,01	0,95	0,35	0,15	-0,02	0,95	-0,30	0,23	0,44	0,07	0,39	0,11
Cr	0,24	0,34	-0,38	0,12	0,80	≤0,05	-0,21	0,41	-0,59	≤0,05	0,86	≤0,05	0,86	≤0,05
Fe	0,24	0,33	-0,39	0,11	0,81	≤0,05	-0,23	0,36	-0,60	≤0,05	0,86	≤0,05	0,86	≤0,05
Li	0,27	0,29	-0,30	0,23	0,75	≤0,05	-0,14	0,57	-0,53	≤0,05	0,81	≤0,05	0,82	≤0,05
Mn	0,24	0,34	-0,59	≤0,05	0,64	≤0,05	-0,44	0,07	-0,32	0,19	0,53	≤0,05	0,54	≤0,05
Hg	0,32	0,20	-0,05	0,86	0,58	≤0,05	-0,24	0,34	-0,40	0,10	0,73	≤0,05	0,70	≤0,05
Zn	0,26	0,30	-0,20	0,44	0,62	≤0,05	-0,09	0,73	-0,43	0,07	0,67	≤0,05	0,64	≤0,05
NOx	0,02	0,94	-0,24	0,35	0,31	0,21	-0,19	0,45	-0,35	0,15	0,39	0,11	0,41	0,09
NH ₄	0,19	0,46	-0,25	0,32	0,62	≤0,05	-0,11	0,67	-0,52	≤0,05	0,72	≤0,05	0,75	≤0,05
P	0,06	0,81	-0,33	0,18	0,65	≤0,05	-0,41	0,09	-0,71	≤0,05	0,85	≤0,05	0,83	≤0,05

B)	Abundância		Riqueza		H'		AMBI		M-AMBI		J'	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Cd	-0,12	0,65	-0,11	0,68	-0,03	0,90	0,35	0,16	-0,02	0,93	0,17	0,49
Pb	-0,18	0,46	-0,09	0,73	0,02	0,92	0,45	0,06	-0,10	0,68	0,43	0,08
Ni	-0,07	0,78	-0,38	0,12	-0,46	0,06	0,34	0,17	-0,27	0,27	-0,12	0,63
Al	-0,13	0,61	-0,27	0,29	-0,34	0,17	0,36	0,14	-0,11	0,66	-0,11	0,66
As	-0,14	0,58	-0,36	0,14	-0,30	0,22	0,57	≤0,05	-0,30	0,22	0,15	0,54
Cu	-0,18	0,47	-0,25	0,33	-0,10	0,70	0,45	0,06	-0,23	0,37	0,40	0,10
Cr	-0,04	0,88	-0,31	0,22	-0,38	0,12	0,41	0,09	-0,24	0,34	-0,06	0,82
Fe	-0,05	0,83	-0,34	0,17	-0,38	0,12	0,45	0,06	-0,27	0,28	-0,03	0,92
Li	-0,0004	0,999	-0,26	0,30	-0,34	0,17	0,41	0,09	-0,18	0,48	-0,06	0,81
Mn	-0,17	0,50	-0,31	0,21	-0,19	0,44	0,20	0,42	-0,20	0,42	0,05	0,85
Hg	-0,21	0,41	-0,32	0,19	-0,29	0,25	0,53	≤0,05	-0,12	0,65	0,09	0,71
Zn	-0,27	0,27	-0,24	0,22	-0,13	0,60	0,50	≤0,05	-0,20	0,42	0,31	0,20
NOx	-0,07	0,79	-0,14	0,58	-0,21	0,40	-0,12	0,63	0,02	0,94	-0,17	0,51
NH ₄	-0,01	0,97	-0,22	0,38	-0,33	0,18	0,24	0,34	-0,12	0,62	-0,12	0,64
P	-0,24	0,34	-0,54	≤0,05	-0,55	≤0,05	0,21	0,40	-0,32	0,19	-0,13	0,61
pH	0,04	0,87	0,45	0,06	0,61	≤0,05	0,87	≤0,05	0,59	≤0,05	0,56	≤0,05
CIT	0,02	0,93	0,65	≤0,05	0,71	≤0,05	0,14	0,58	0,77	≤0,05	0,46	0,054
COT	-0,07	0,77	-0,24	0,33	-0,17	0,51	0,64	≤0,05	-0,17	0,50	0,16	0,54
Cascalho	0,19	0,45	0,85	≤0,05	0,73	≤0,05	0,002	0,99	0,62	≤0,05	0,32	0,19
Areia	0,34	0,17	0,79	≤0,05	0,82	≤0,05	0,22	0,38	0,78	≤0,05	0,43	0,07
Silte	0,27	0,27	-0,46	0,06	-0,36	0,15	0,50	≤0,05	-0,25	0,31	0,10	0,70
Argila	0,23	0,36	-0,41	0,10	-0,32	0,19	0,51	≤0,05	-0,22	0,38	0,09	0,72

NOx – NO₂ + NO₃ ; a vermelho, coeficientes de correlação que apresentam significância (p≤0,05).

Tabela III: Intervalo de resultados por estação do ano de Mucha e Costa (1999), expressos em mg L⁻¹.

	NH ₄	NO _x	PO ₄
Outono	1,18 - 4,99	0,26 - 1,17	0,26 - 57,41
Inverno	0,60 - 2,36	0,16 - 0,87	0,09 - 58,97
Primavera	1,41 - 4,24	0,14 - 0,37	0,23 - 10,51

Tabela IV: Intervalo de resultados dos locais amostrados por Valença *et al.* (2012) com localização aproximada aos locais de amostragem do presente estudo.

As (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Hg (mg kg ⁻¹)	Ni (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
18,6 – 24	58-88	44-400	0,33 - 0,56	28-52	30-162	226-858

Tabela V: Parâmetros físico-químicos (percentagem de Carbono orgânico, argila e areia, e concentrações de alguns metais pesados em µg mg⁻¹) de vários estuários portugueses. Valores máximos e mínimos (*adaptado* de Mil-Homens *et al.*, 2014).

	C org (%)	Arg. (%)	Areia (%)	Al (%)	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Minho	0,0 0,6	0 40	81 99	2,7 7,4	3,5 27	0,02 0,23	34 64	1,6 15	<0,007 0,05	2,8 11	13 29	9,4 88
Neiva	0,2	0	39 72	3,9 4,3	5,3 7,5	0,03 0,04	33 44	5,9 6,8	<0,007	3,3 5,4	23 31	41 294
Lima	0,0 2,0	0 22	56 97	3,9 6,6	3,5 16	0,02 0,14	27 122	3,3 20	<0,007 0,07	2,1 130	22 31	29 89
Cávado	0,2 0,3	0	79 99	3,2 5,3	3,0 5,2	0,03 0,16	15 24	2,0 14,4	<0,007 0,03	1,4 4,1	16 26	45 123
Ave	0,5 5,0	0 80	14 99	5,2 12,1	8,9 20	0,07 0,65	24 73	5,8 87,6	0,01 0,16	7,0 25	19 60	138 401
Leça	3,0 5,0	67 88	8 27	8,4 9,5	18 22	0,30 0,80	67 118	34 103	0,15 0,31	23 24	50 93	172 452
Douro	0,2 0,5	0 8	35 91	3,2 5,4	4,5 198	0,04 0,26	22 35	3,4 27,7	0,01 0,04	2,9 9,5	15 25	17 185
Ria de Aveiro	0,0 3,4	0 92	6 100	1,5 8,6	0,7 3,9	0,00 0,33	19 43	14 29	<0,007 0,73	2,1 21	8,9 34	2,9 119
Mond.	0,1 0,4	0	100	2,9 4,1	2,1 4,4	0,01 0,05	17 37	1,3 2,5	<0,007 0,01	2,6 3,9	15 20	12 26
Lis	0,0 0,1	0	91 98	0,6 0,8	0,4 0,5	<0,001	25 39	1,6 49	<0,007	0,4 0,9	3,8 44	14 28
Tagus	0,0 3,0	0 90	7 100	4,6 9,7	3,9 26	0,01 0,34	22 68	2,4 49	0,01 0,43	3,3 35	20 64	21 196
Sado	0,2 2,0	4 73	18 92	1,3 9,3	2,0 19	0,01 0,21	11 154	16 74	0,02 0,31	3,4 77	8,9 43	11 207
Mira	0,3 2,0	0 93	3 99	0,5 9,6	8,1 45	0,01 0,23	21 104	1,3 44	<0,007 0,68	4,2 62	2,1 38	8 120
Arade	0,5 2,5	0 52	43 92	5,6 7,7	12,0 20	0,08 0,21	37 79	17 36	0,01 0,09	19 36	16 24	88 116
Guad.	0,0 2,0	0 88	7 100	1,5 11	5,9 100	0,03 0,46	8,7 93	7,8 53	0,01 0,33	1,7 43	9,1 46	50 221

Tabela VI: Taxonomia dos indivíduos encontrados nos sedimentos do estuário do Sado e correspondente abreviatura.

Filo: classe	ORDEM/SUBORDEM e FAMILIA	Género/espécie	Sigla
Annelida Polychaeta	COSSURIDAE (Day, 1963)	<i>Cossura longocirrata</i> (Webster & Benedict, 1887)	Coss
	SPIONIDAE (Grube, 1850)	<i>Polydora</i> sp, (Bosc, 1802)	Poly
		<i>Streblospio</i> sp, (Webster, 1879)	Stre
	CIRRATULIDAE (Ryckholt, 1851)		Cirr
	CAPITELLIDAE (Grube, 1862)	<i>Notomastus latericeus</i> (Sars, 1851)	Noto
		<i>Notomastus hemipodus</i> (Hartman, 1945)	Notom
	SABELLIDAE (Latreille, 1825)		Sab
	ORBINIIDAE (Hartman, 1942)	<i>Scoloplos</i> sp, (Blainville, 1828)	Scol
	SYLLIDAE (Grube, 1850)	<i>Exogone</i> sp, (Ørsted, 1845)	Exog
	PARAONIDAE (Cerruti, 1909)	<i>Cirrophorus eliasoni</i> (Mackie, 1991)	Cir
	OWENIIDAE (Rioja, 1917)	<i>Galathowenia oculata</i> (Zachs, 1923)	Gala
	NEPHTYIDAE (Grube, 1850)	<i>Nephtys cirrosa</i> (Ehlers, 1868)	Neph
	CHAETOPTERIDAE (Audouin & Milne Edwards, 1833)	<i>Spiochaetopterus</i> sp, (Sars, 1856)	Spio
	AMPHARETIDAE (Malmgren, 1866)	<i>Paramytha ossicola</i> (Queirós, R., E., K. & Hilário, 2017)	Para
		<i>Melinna</i> sp, (Malmgren, 1866)	Meli
	GLYCERIDAE		Glyc
	TEREBELLIDAE (Johnston, 1846)		Ter
ONUPHIDAE (Kinberg, 1865)			Diop
Annelida: Oligochaeta			Oli
Nematoda			Nem
Arthropoda	AMMOTHEIDAE (Dohrn, 1881)		Amm
	COROPHIIDAE (Leach, 1814)	<i>Apocorophium lacustre</i> (Vanhöffen, 1911)	Apoc
	ANTHURIDAE (Leach, 1814)	<i>Cyathura carinata</i> (Krøyer, 1847)	Cyat
	AMPELISCIDAE (Krøyer, 1842)		Amp
	CUMACEA		cum
	CAPRELLIDAE (Leach, 1814)	<i>Pariambus</i> sp, (Stebbing, 1888)	Pari
	Cirolanidae		Cir
	GAMMARIDEA		Gam
Mollusca	CARDIIDAE (Lamarck, 1809)		Car
	MACTRIDAE (Lamarck, 1809)		Mac
	CORBULIDAE (Lamarck, 1818)	<i>Corbula gibba</i> (Olivi, 1792)	Corb

Tabela VII.: Abundância dos organismos identificados nos sedimentos do estuário do Sado.

	Setembro 2019								Fevereiro 2020								
	1.1	1.2	1.3	4.1	4.2	5.1	5.2	5.3	1.1	1.2	1.3	4.1	4.2	4.3	5.1	5.2	5.3
Oli		2		6	6	50	1		81	10	29	450	56	288	14	7	12
Coss		15	32	3	8	114		81	1			1309	14	644	170	59	50
Stre	91	159	86	64	238				48	279	27	257	1	23			
Poly																5	17
Cirr	4	19	7	42	94	15	2	11	4	3	2	354	35	75	107	83	52
Noto															1	1	10
Notom																1	2
Sab	3	5			1							44	1	37			
Scol									2		1						
Exog				8	38				7	1	12	40	24	19	30	27	33
Cir				36	53				1			1				1	
Gala												3			83	113	29
Neph								3					1	1		1	
Spio															8	13	7
Para				3	5											1	
Meli																3	
Ter															3	6	
Glyc					1												
Diop												1		1			
Nem									86	74	25	2623	24	1415	153	41	76
Amm													1				
Apoc					7					1		1		1		1	1
Cyat		1		5	30				2	9	1				1	7	1
Cum												3					
Pari														1			
Amp												7	1	5	19	26	13
Gam					4			1				4	5			5	6
Car													1				2
Mac															1	1	3
Corb						7	2								1	3	1
Ci										1							
Total	98	201	125	167	485	186	5	96	232	378	97	5097	164	2510	593	407	316