

# **Avaliação da contaminação das plantas e pólen presentes na antiga mina de tungsténio e estanho de Regoufe**

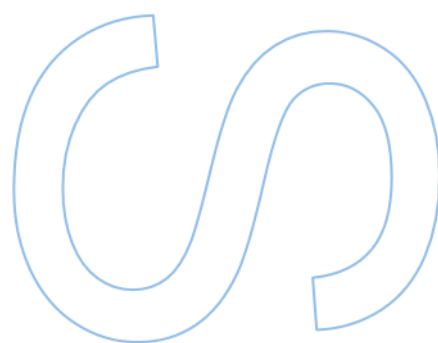
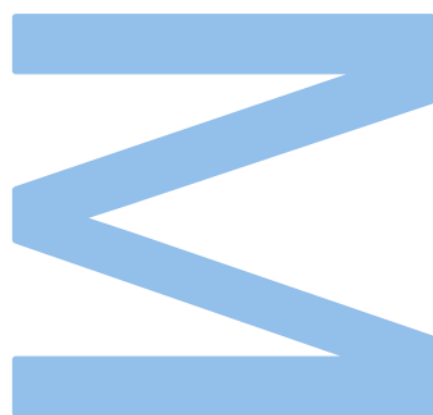
**Filipa Alexandra Sequeira Romão**

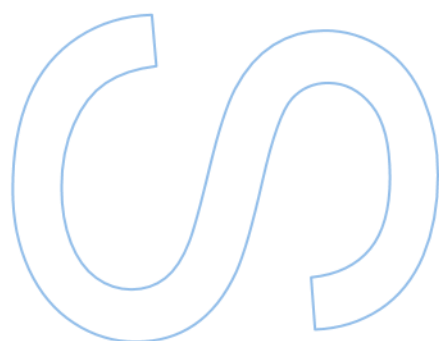
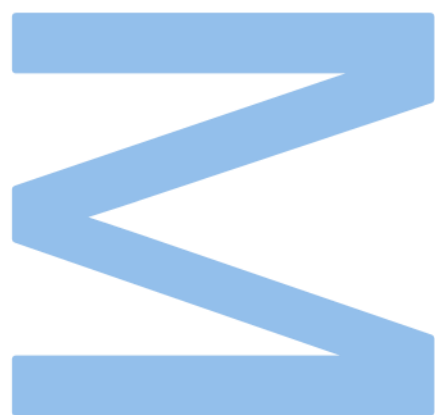
Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente

Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território  
2022/2023

**Orientador**

Prof<sup>a</sup>. Helena Isabel da Costa Ribeiro, Faculdade de Ciências da  
Universidade do Porto





## Declaração de Honra

Eu, Filipa Alexandra Sequeira Romão, inscrito(a) no Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo da presente dissertação/relatório de estágio/projeto Avaliação da contaminação das plantas e pólen presentes na antiga mina de tungsténio e estanho de Regoufe reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar esta dissertação/relatório de estágio/projeto Avaliação da contaminação das plantas e pólen presentes na antiga mina de tungsténio e estanho de Regoufe, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados na presente dissertação/relatório de estágio/projeto Avaliação da contaminação das plantas e pólen presentes na antiga mina de tungsténio e estanho de Regoufe quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Filipa Alexandra Sequeira Romão

Porto, 30/06/2023

No âmbito desta dissertação foram efetuadas as seguintes comunicações:

- Romão, F., Pereira, S., Guedes, A., Sant'Ovaia, H., Abreu, I., Ribeiro, H. 2023. Assessment of pollen traits variability in the Regoufe mining area: the example of *Erica arborea*. Jornadas do ICT, 2 e 3 de fevereiro, Braga, Portugal – Poster.
- Romão, F., Pereira, S., Guedes, A., Sant'Ovaia, H., Abreu, I., Ribeiro, H. 2023. Avaliação da variabilidade das propriedades do pólen na área mineira de Regoufe: o exemplo da *Erica arborea*. Workshop do Projeto SHS: Soil health surrounding former mining areas: characterization, risk analysis, and intervention, 3 de março, Porto, Portugal – Apresentação oral.
- Romão, F., Pereira, S., Monteiro, M., Ribeiro, J., Guedes, A., Sant'Ovaia, H., Azenha, M., Abreu, I., Ribeiro, H. 2023. Avaliação da contaminação da vegetação por elementos potencialmente tóxicos na antiga área mineira de Regoufe. Workshop Final do Projeto SHS: Soil health surrounding former mining areas: characterization, risk analysis, and intervention, 3 de março, Porto, Portugal – Apresentação oral.

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projeto “SHS: Soil health surrounding former mining areas: characterization, risk analysis, and intervention”, NORTE-45-2020-75 - Sistema de Apoio à Investigação Científica e Tecnológica - “Projetos Estruturados de I&D&I”- Horizonte Europa, Ref. NORTE-01-0145-FEDER-000056

## Agradecimentos

Gostaria de expressar o meu sincero agradecimento às seguintes pessoas que tornaram possível a realização desta dissertação e me proporcionaram uma grande ajuda ao longo deste percurso.

Em primeiro lugar às professoras, Helena Isabel da Costa Ribeiro e Ilda da Conceição Abreu de Noronha, pela oportunidade de realização deste estudo e por todo o conhecimento transmitido, conselhos e soluções que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho, pela ajuda e disponibilidade prestada.

À Sónia Pereira, pelo contributo significativo da sua ajuda, ensinamentos e indicações ao longo deste estudo, também pelos bons momentos passados em laboratório.

À minha família, pelo incentivo fundamental durante este percurso, pelo apoio incondicional e dedicação, por acreditarem sempre em mim, não só ao longo do meu caminho académico, mas também nas diversas etapas da vida.

Ao meu namorado, por toda a motivação e total disponibilidade em me ajudar, também pelos momentos de descontração que foram importantes neste período desafiante.

Aos meus amigos que me acompanharam neste percurso, pelos momentos compartilhados, por toda a interajuda, amizade e bons momentos passados.

Instituto de Ciências da Terra (ICT), financiado por fundos nacional atribuídos pela FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., através dos projetos UIDB/04683/2020 e UIDP/04683/2020.

## Resumo

O abandono da mina de W-Sn de Regoufe (Arouca) e a falta de medidas de remediação, potencia a dispersão de elementos potencialmente tóxicos (EPT) no solo e absorção pelas plantas, existindo a possibilidade de atingirem o pólen. Estes elementos em concentrações excessivas podem causar alterações nos ecossistemas e riscos para a saúde pública.

Este estudo pretende avaliar a influência do solo da área mineira de Regoufe na bioacumulação de EPT (As, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd e Co) por *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. e em algumas características do pólen de *E. arborea* L.

Recolheram-se amostras de solo e plantas na zona de influência mineira e num local controlo próximo. Realizaram-se análises físico-químicas do solo (pH, condutividade elétrica e matéria orgânica) e determinação da composição química dos solos, plantas e pólen. Neste último foi avaliada a fertilidade, conteúdo proteico e estrutura química da parede.

Os resultados mostram que os solos, plantas e pólen estão enriquecidos em EPT, destacando-se o As. Nas plantas verificou-se uma diluição de EPT do caule para as flores, observando-se uma maior acumulação na *C. vulgaris* L. No pólen, os teores de EPT foram superiores aos verificados no resto da planta. Observou-se uma correlação entre a biodisponibilidade dos EPT no solo e a sua bioacumulação no pólen. Foi possível agrupar os locais em 3 grupos, sendo um deles associado à zona de processamento do minério, onde se registaram os valores mais baixos das características polínicas e os níveis mais elevados da maioria dos EPT.

Palavras-chave: Mina de Regoufe, elementos potencialmente tóxicos (EPT), solos, plantas, pólen, *Erica arborea* L., *Calluna vulgaris* L.

## Abstract

The abandonment of the Regoufe W-Sn Mine (Arouca) and lack of remedial measures, enhances the dispersion of potentially toxic elements (PTE) into the soil and uptake by plants, with the possibility of reaching the pollen. These elements in excessive concentrations can cause changes in ecosystems and risks to public health.

This study aims to evaluate the influence of the soil of the Regoufe mining area on PTE bioaccumulation (As, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd and Co) by *Erica arborea* L. and *Calluna vulgaris* L. and in some pollen characteristics of *E. arborea* L.

Soil and plant samples were collected in the mining influence zone and at a nearby control site. Physicochemical analyses of the soil (pH, electrical conductivity, and organic matter) and determination of the chemical composition of soils, plants and pollen were carried out. In the latter, fertility, protein content and chemical wall structure were evaluated.

The results show that soils, plants, and pollen are enriched in PTE, especially As. In plants, there was a dilution of PTE from the stem to the flowers, with a greater accumulation in *C. vulgaris* L. In pollen, PTE contents were higher than in the rest of the plant. A correlation was observed between the bioavailability of PTE in soil and their bioaccumulation in pollen. It was possible to group the sites into 3 groups, one of them being associated with the ore processing area, where the lowest values of pollen traits and the higher levels of most PTE were attained.

**Keywords:** Regoufe Mine, potentially toxic elements (PTE), soils, plants, pollen, *Erica arborea* L., *Calluna vulgaris* L.

# Índice

|                                                          |      |
|----------------------------------------------------------|------|
| Lista de Tabelas .....                                   | viii |
| Lista de Figuras .....                                   | ix   |
| Lista de Abreviaturas .....                              | xi   |
| 1. Introdução.....                                       | 2    |
| 1.1. Motivação .....                                     | 2    |
| 1.2. Objetivos .....                                     | 3    |
| 2. Estado de Arte .....                                  | 5    |
| 3. Enquadramento da área de estudo.....                  | 13   |
| 3.1. Enquadramento geográfico.....                       | 13   |
| 3.2. Enquadramento histórico da exploração mineira ..... | 13   |
| 3.3. Enquadramento geomorfológico .....                  | 15   |
| 3.4. Enquadramento geológico .....                       | 15   |
| 3.5. Tipo de solo .....                                  | 17   |
| 3.6. Coberto vegetal .....                               | 18   |
| 3.7. Caracterização climática.....                       | 18   |
| 4. Material e métodos .....                              | 21   |
| 4.1. Amostragem .....                                    | 21   |
| 4.2. Processamento e análise das amostras .....          | 23   |
| 4.2.1. Solos .....                                       | 23   |
| 4.2.1.1. Determinação do pH.....                         | 23   |
| 4.2.1.2. Determinação da condutividade elétrica .....    | 23   |
| 4.2.1.3. Determinação do teor de matéria orgânica .....  | 23   |
| 4.2.1.4. Composição química .....                        | 24   |
| 4.2.2. Plantas .....                                     | 24   |
| 4.2.2.1. Composição química .....                        | 24   |
| 4.2.3. Pólen .....                                       | 27   |

|          |                                                            |    |
|----------|------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3.1. | Fertilidade polínica .....                                 | 27 |
| 4.2.3.2. | Extração e quantificação do conteúdo proteico solúvel..... | 28 |
| 4.2.3.3. | Estudo do perfil proteico polínico por SDS-PAGE.....       | 28 |
| 4.2.3.4. | Microspectroscopia Raman .....                             | 29 |
| 4.2.3.5. | Composição química .....                                   | 31 |
| 4.3.     | Análise estatística.....                                   | 31 |
| 5.       | Resultados.....                                            | 33 |
| 5.1.     | Solos .....                                                | 33 |
| 5.1.1.   | Propriedades físico-químicas.....                          | 33 |
| 5.1.2.   | Composição química .....                                   | 34 |
| 5.2.     | Plantas .....                                              | 35 |
| 5.2.1.   | Composição química .....                                   | 35 |
| 5.3.     | Pólen .....                                                | 36 |
| 5.3.1.   | Fertilidade polínica.....                                  | 36 |
| 5.3.2.   | Conteúdo proteico solúvel .....                            | 37 |
| 5.3.3.   | Microspectroscopia Raman .....                             | 39 |
| 5.3.4.   | Composição química .....                                   | 40 |
| 5.4.     | Análise estatística.....                                   | 41 |
| 6.       | Discussão .....                                            | 44 |
| 7.       | Conclusões.....                                            | 58 |
|          | Referências Bibliográficas .....                           | 61 |
|          | Anexo 1 – Soluções químicas.....                           | 75 |
|          | Anexo 2 – Valores obtidos por XRF .....                    | 76 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Informação detalhada sobre os locais de amostragem na zona mineira de Regoufe.....                                                                                                                                                                                                                                    | 22 |
| Tabela 2 - Valores de pH, condutividade elétrica e matéria orgânica das amostras de solo recolhidos na zona mineira de Regoufe. ....                                                                                                                                                                                             | 33 |
| Tabela 3 - Concentração de elementos potencialmente tóxica - EPT (mg/kg) medida nas amostras de solo. Para cada elemento, os valores mais elevados são destacados a negrito e os mais baixos a itálico. Valores obtidos por ICP-MS (VR – valores de referência mundial para solos não contaminados (Kabata-Pendias, 2010)). .... | 34 |
| Tabela 4 - Concentração de elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras de flores, folhas e caules das espécies <i>Erica arborea</i> L. e <i>Calluna vulgaris</i> L. . Valores obtidos por ICP-MS.....                                                                                                     | 35 |
| Tabela 5 - Concentração dos elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras do pólen da espécie <i>Erica arborea</i> L. Valores obtidos por ICP-MS (s.d. – sem dados; VL - valores limite para pólen de abelha (Campos et al., 2008)). ....                                                                   | 40 |
| Tabela 6 - Concentração dos elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras de flores, folhas e caules das espécies <i>Erica arborea</i> L. e <i>Calluna vulgaris</i> L. . Valores obtidos por XRF – método mining (M) e soils (S) (n.d. – não detetado). ..                                                  | 76 |
| Tabela 7 - Concentração dos elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras do pólen da espécie <i>Erica arborea</i> L. . Valores obtidos por XRF – método mining (M) e soils (S) (n.d. – não detetado). ....                                                                                                 | 77 |

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Complexo mineiro de Regoufe, Arouca. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 13 |
| Figura 2 - Complexo mineiro de Regoufe no (A) período de funcionamento e (B) após encerramento das instalações (fonte: Mindat.org). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 14 |
| Figura 3 - Carta hipsométrica da região de Regoufe, com área de estudo representada com retângulo azul (retirado de Tavares, 2006). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 15 |
| Figura 4 - Mapa geológico da região de Regoufe, com área de estudo simbolizada a tracejado (adaptado da Folha 13-D, Oliveira de Azeméis, da Carta Geológica de Portugal à escala 1:50000): 1 - Super Grupo Dúrico-Beirão; 2 - Quartzodiorito biotítico (Maciço de Arouca); 3 - Granito de Regoufe; 4 - Granito da Serra de Freitas; 5 - Filões de quartzo; 6 - Doleritos ( $\delta$ ) e rochas básicas anfibolitizadas ( $\delta'z$ ); 7 - Isógrada de metamorfismo regional; 8 – Isógrada de metamorfismo de contacto (retirado de Sousa, 2016). .... | 16 |
| Figura 5 - Carta de solos simplificada da região envolvente à área de estudo (adaptada da Carta de Solos de Portugal à escala 1:1000000, 1971) (retirado de Favas, 2008). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 17 |
| Figura 6 - Variações da precipitação e temperatura médias anuais, referentes ao período de 1965 a 1995 (estação climatológica de Arouca) (retirado de Favas, 2008). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 19 |
| Figura 7 - Mapa com a localização dos 5 pontos amostrados, identificados a laranja, na zona mineira de Regoufe. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 21 |
| Figura 8 - Plantas amostradas (A) espécie <i>Erica arborea</i> L. (B) espécie <i>Calluna vulgaris</i> L. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 22 |
| Figura 9 - Porção dos solos amostrados nos cadinhos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 24 |
| Figura 10 - Imagem ilustrativa do processo de fluorescência de raio-X (fonte: (fonte: ThermoFisher Scientific). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 26 |
| Figura 11 - Materiais utilizados para determinação composição química das plantas: (A) caixas de medição com as respetivas amostras, (B) Espectrómetro portátil de raio-X (XMET 7000). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 26 |
| Figura 12 - (A) e (B) Tétradas do pólen de <i>Erica arborea</i> L. (fonte: PalDat - Palynological Database). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 27 |
| Figura 13 - Pólen da espécie <i>Erica arborea</i> L.: (A) germinado e (B) não germinado, observado ao microscópio (10x). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| Figura 14 - Imagem ilustrativa do princípio Raman (fonte: Blog Edinburgh Instruments). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30 |

|                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15 - Resultados da taxa de germinação das amostras de pólen após 24h de incubação (letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ ). .....                                               | 37 |
| Figura 16 - Resultados do teor de proteínas solúveis do pólen nos diferentes locais amostrados (letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ ). .....                                         | 37 |
| Figura 17 - Resultados do gel SDS-PAGE, corado com azul de Coomassie, de proteínas solúveis totais dos extratos de pólen de <i>Erica arborea</i> L. .Pesos moleculares das bandas expressos em KDa. ....                           | 38 |
| Figura 18 - Espectros médios Raman do pólen de <i>Erica arborea</i> L. dos 5 locais de amostragem analisados, com os 7 principais picos assinalados a tracejado. ....                                                              | 39 |
| Figura 19 - Dendrograma hierárquico da análise de Cluster baseada em (A) parâmetros do pólen (B) composição química do pólen e vegetação de <i>Erica arborea</i> L. (C) todas as variáveis em estudo – solo, plantas e pólen. .... | 41 |

## Lista de Abreviaturas

|                 |                                                                                                                                           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ANOVA</b>    | Análise de variância (Analysis of variance)                                                                                               |
| <b>APS</b>      | Persulfato de Amónio (Ammonium Persulfate)                                                                                                |
| <b>CPM</b>      | Companhia Portuguesa de Minas                                                                                                             |
| <b>DGAOT</b>    | Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território                                                                         |
| <b>EDM</b>      | Empresa de Desenvolvimento Mineiro                                                                                                        |
| <b>EPT</b>      | Elementos Potencialmente Tóxicos                                                                                                          |
| <b>FCUP</b>     | Faculdade de Ciências da Universidade do Porto                                                                                            |
| <b>ICP-MS</b>   | Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (Inductively coupled plasma mass spectrometry)                                  |
| <b>MO</b>       | Matéria orgânica                                                                                                                          |
| <b>PBS</b>      | Solução-Tampão de Fosfato (Phosphate Buffer Saline)                                                                                       |
| <b>pH</b>       | Potencial de Hidrogénio (Potential of Hydrogen)                                                                                           |
| <b>ppm</b>      | Partes por milhão (Parts per million)                                                                                                     |
| <b>SDS-PAGE</b> | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) |
| <b>TEMED</b>    | N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina<br>(N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine)                                                          |
| <b>TFSA</b>     | Terra Fina Seca ao Ar                                                                                                                     |
| <b>Tris</b>     | Tris(hidroximetil)aminometano<br>(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)                                                                        |
| <b>XRF</b>      | Fluorescência de raios-X (X-ray fluorescence)                                                                                             |
| <b>ZCI</b>      | Zona Centro Ibérica                                                                                                                       |

# Capítulo 1

---

## Introdução

# 1. Introdução

## 1.1. Motivação

A presente dissertação de título “Avaliação da contaminação das plantas e pólen presentes na antiga mina de tungsténio e estanho de Regoufe” foi desenvolvida no âmbito do Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente do Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território (DGAOT) da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

A exploração mineira é uma atividade antropogénica cujo objetivo consiste na extração, processamento e tratamento do minério, a fim de o comercializar. As origens mais remotas destas explorações remete-nos para épocas do passado, como o paleolítico, onde desde então se desenvolveram novas técnicas e tecnologias para extração e tratamento dos minérios, devido ao crescimento populacional e, consequente, aumento da procura e competição pelos recursos minerais (Sousa, 2016).

Apesar da atividade mineira ser considerada uma atividade importante para o desenvolvimento socioeconómico, esta apresenta potenciais impactos ambientais negativos. Perante a falta de fiscalização ou inexistência de planos de recuperação muitas áreas mineiras foram deixadas num estado de abandono generalizado que pode potenciar a acumulação e dispersão de elementos potencialmente tóxicos (EPT) no meio ambiente (Fonseca et al., 2020), podendo por exemplo dispersar-se no solo e serem absorvidos pelas plantas resultando em perturbações no mesmo.

Embora Portugal seja um país de pequena dimensão, este possui uma grande diversidade geológica e de recursos minerais que, por sua vez, podem vir a ser explorados. No entanto, muitas minas encontram-se atualmente desativadas e abandonadas, tendo sido identificadas, pela Empresa de Desenvolvimento Mineiro (EDM), um total de 175 áreas mineiras ([www.edm.pt](http://www.edm.pt)).

O complexo mineiro de Regoufe, situado no concelho de Arouca, é um dos exemplos de minas abandonadas em Portugal. Esta mina foi extensivamente explorada durante a Segunda Guerra Mundial, na qual se extraía, em veios de quartzo, tungsténio e estanho para produção de material bélico, acabando por cessar a sua atividade na década de 1970 (Silva & Ribeiro, 2006). Face à falta de intervenção ambiental após o fecho da mina é importante avaliar o possível impacto ambiental deixado pela atividade mineira.

No entanto, a preocupação com esta área mineira não se relaciona unicamente com questões ambientais, mas também com a importância patrimonial da mesma. Apesar do evidente estado de degradação das instalações e infraestruturas presentes, a mina de Regoufe retém um valor patrimonial fundamental para a história mineira portuguesa do século XX. Para além da presença das infraestruturas, também as memórias da sua exploração marcaram, e continuam a marcar, a comunidade local que deseja preservar os relatos da época (Lopes et al., 2022).

Adicionalmente à questão histórica, a alteração provocada na paisagem pela presença de ruínas, de galerias e escombreyras, atribui ao local uma beleza particular que confere um grande interesse do ponto de vista da paisagem cultural e da arqueologia mineira.

A mina de Regoufe, considerada como um património geológico, integra o Geoparque de Arouca, membro das Redes Europeia e Global de Geoparques sob a tutela da UNESCO. Deste modo, a área mineira requer conservação ambiental e patrimonial a fim de preservar este complexo mineiro e a história a ele associado.

## 1.2. Objetivos

Este estudo pretende investigar a influência da variabilidade do grau de contaminação do solo da antiga exploração mineira de Regoufe, na bioacumulação de EPT por *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. e nas propriedades do pólen de *Erica arborea* L.

Para isso, recolheram-se amostras de solo e plantas em locais distintos da zona mineira e foi analisado:

- a composição química, teor de matéria orgânica, condutividade elétrica e pH do solo;
- a composição química das folhas e flores de *Calluna vulgaris* L., e dos caules, folhas e pólen de *Erica arborea* L.;
- a fertilidade polínica, conteúdo proteico solúvel e composição da parede do pólen.

Tanto quanto sabemos, esta é a primeira vez que se efetua a análise de bioacumulação de contaminantes no grão de pólen e sua correlação com o solo.

Deste modo, o trabalho de campo teve lugar nas instalações da antiga área mineira de Regoufe em Arouca, ao passo que, o trabalho laboratorial decorreu no laboratório de palinologia da FCUP e nas instalações do DGAOT.

## Capítulo 2

---

### Estado de Arte

## 2. Estado de Arte

A busca e interesse no uso de recursos minerais por parte do Homem é quase tão antiga como a sua própria existência, de tal modo que períodos históricos estão associados a este tipo de recursos como é o caso do paleolítico (através do uso e produção de artefactos em pedra lascada), mesolítico, neolítico, seguindo-se a idade dos metais (idade do cobre, do bronze e do ferro), na qual o ser humano já começava utilizar, ainda que de forma rudimentar, outros minerais em particular os metálicos que se encontravam à disposição, mas que até à data eram inutilizáveis (Oliveira et al., 2007). A Revolução industrial, que ocorreu no final do século XVIII e inícios de XIX, alterou drasticamente não só as técnicas industriais como também o uso dos minerais (Oliveira et al., 2007) o que provocou um aumento significativo dos contributos de fontes antropogénicas que excederam frequentemente a introdução de elementos potencialmente tóxicos no ambiente por via natural (Adriano, 2001).

Os Elementos Potencialmente Tóxicos, também designados por EPT, são metais/metaloídes, poluentes de natureza inorgânica, de densidade relativamente alta ( $> 5 \text{ g/cm}^3$ ), que se encontram naturalmente presentes no ambiente, em pequenas concentrações, por serem constituintes naturais da crosta terrestre (Adriano, 2001; Callender, 2004). Muitos deles são micronutrientes essenciais exigidos pelos organismos em baixas concentrações (como é o caso por exemplo do zinco (Zn), Manganês (Mn), Cu (cobre), Fe (ferro), B (boro), entre outros), só que quando biodisponíveis em concentrações elevadas podem causar alterações nos ecossistemas e riscos para a saúde humana (Thornton, 1996; Adriano, 2001).

No presente trabalho, utiliza-se a designação de EPT que inclui metais pesados e metalóides (com destaque do cádmio (Cd), chumbo (Pb), zinco (Zn), cobre (Cu), arsénio (As), manganês (Mn), níquel (Ni), cobalto (Co) e cromo (Cr)), considerando que são elementos que causam toxicidade, quando em elevadas concentrações, e podem estar presentes na área de estudo.

Os EPT podem surgir naturalmente no meio ambiente através da meteorização das rochas ou minerais, de erupções vulcânicas, fogos florestais, e/ou por fontes antropogénicas como a agricultura (uso de fertilizantes e pesticidas), queima de combustíveis fósseis, indústria metalúrgica (extração mineira e fundição de minérios metálicos), entre outros (Adriano, 2001; Callender, 2004).

A contaminação pelos EPT por intermédio de fontes antropogénicas intensificou-se fortemente devido à aceleração da taxa de crescimento da população, ao aumento da urbanização e industrialização (Adriano, 2001; Loredó et al., 2003; Callender, 2004; Wu et al., 2015). Consequentemente, a distribuição e biodisponibilidade destes elementos nos mais variados compartimentos ambientais têm sido também alteradas constituindo um potencial perigo para os seres vivos, uma vez que o grau de toxicidade, por conseguinte, é também alterado (Traina & Laperche, 1999). De entre as várias fontes antropogénicas responsáveis pela introdução de EPT no ambiente, neste estudo interessa destacar a atividade mineira.

A indústria extrativa, que inclui a exploração mineira, baseia-se na extração de componentes da crosta terrestre com valor económico, a fim de fornecer matérias-primas essenciais ao desenvolvimento da qualidade de vida das sociedades. Se por um lado esta atividade é vantajosa, por outro é responsável pela produção de grandes quantidades de resíduos, em particular escomboreiras, criando impactes significativos no meio envolvente (Hosseinpour et al., 2022).

Embora, a indústria mineira esteja atualmente sob fortes restrições ambientais, com o objetivo de prevenir e/ou minimizar os efeitos negativos desta atividade, tal não era o caso no passado (Fonseca et al., 2020). Com a falta de regulamentação mineira, a deposição não controlada dos rejeitos mineiros e a ausência de tratamento dos mesmos, os resíduos mineiros e outros materiais potencialmente contaminados eram depositados e abandonados à superfície (Lottermoser, 2007) potenciando danos ambientais, uma vez que os EPT associados a esta atividade, com características intrínsecas específicas de baixa coesão e reduzida dimensão, são facilmente acumulados e dispersos para os vários ecossistemas (em particular o solo e a água) (Razo et al., 2004; Navarro et al., 2008; Fonseca et al., 2020). Isto conduz à improdutividade dos locais, podendo colocar em risco a vida vegetal e animal das áreas envolventes.

O risco associado à contaminação pelos EPT e à sua persistência no meio ambiente deve-se, sobretudo, ao seu carácter não degradável (Kirpichtchikova et al., 2006), pelo que um dos problemas ambientais mais significativos em áreas mineiras abandonadas é a elevada concentração de EPT no solo (Reyes et al., 2021).

O solo é um componente vital para outros ecossistemas terrestres dado ser um sistema complexo e heterogéneo constituído por uma matriz sólida, líquida e gasosa (Bradl, 2004), por sua vez é também o principal reservatório de contaminantes libertados no ambiente por atividades antropogénicas (Kirpichtchikova et al., 2006).

Os elementos podem ser encontrados no solo em dois estados diferentes de biodisponibilidade e mobilidade: formas mais móveis e biodisponíveis (presentes na solução do solo ou como iões de troca em fases orgânicas e inorgânicas) ou em formas mais imóveis (fixos ou precipitados em fases orgânicas e inorgânicas) (Adriano, 2001).

Os EPT ficam retidos no solo sobretudo por meio de processos de adsorção, os quais dependem da textura do solo, do pH, do tipo, especiação e competição das espécies iónicas envolvidas, e do tempo de contacto (Bradl, 2004). Para compreender os processos de contaminação a longo prazo é necessário um conhecimento dos fatores que controlam a libertação, mobilidade e dispersão dos EPT (Lottermoser, 2007).

Em consequência da intensa exploração registada nos jazigos minerais, que provocou o esgotamento dos mesmos e/ou das flutuações dos preços dos metais nos mercados mundiais que tornou economicamente inviável a sua exploração, uma parte significativa das explorações mineiras foi encerrada e abandonada, sem a existência de qualquer plano de recuperação ambiental (Oliveira et al., 2002; Lottermoser, 2007). Isto provocou, não só, problemas sociais e económicos para as populações, mas maioritariamente impactes sobre o meio ambiente.

O complexo mineiro de Regoufe, situado no concelho de Arouca, é um exemplo concreto de uma mina abandonada. Esta mina enquadrou-se na exploração do jazigo W-Sn desde os começos do século XX, com o despontar da 1ª grande Guerra Mundial, até à década 70 do mesmo século. O auge da sua exploração, assim como de outras minas na região, ocorreu durante o período coincidente com a 2ª Guerra Mundial, registando-se uma “febre de ouro negro” na qual duas forças opostas no cenário de guerra – ingleses e alemães – exploravam, a poucos quilómetros de distância, nas minas de Regoufe e Rio de Frades, o minério tungsténio com vista a produzir armas e munições utilizadas nos campos de batalha. Perante o fim do conflito armado, verificou-se uma diminuição na procura e consumo do minério, assim como o aparecimento de outras minas para exploração, o que levou ao encerramento e, consequente, abandono da mina de Regoufe em meados da década de 70 (Silva & Ribeiro, 2006).

Em Portugal, o Estudo Base para a Reabilitação de Áreas Mineiras Degradadas, estudo de inventariação de áreas mineiras abandonadas realizado pela EDM, permitiu o reconhecimento de 175 áreas mineiras abandonadas prioritárias no que diz respeito aos impactes ambientais associados, com o intuito de reabilitá-las a nível ambiental, assim como a nível de segurança ([www.edm.pt](http://www.edm.pt)). Tendo em conta os riscos relacionados com o avançado estado de degradação das infraestruturas mineiras da execução deste

estudo adveio o desenvolvimento de projetos que visam eliminar ou minimizar as questões relacionadas com a segurança das infraestruturas mineiras e das seções industriais associadas. O documento "Avaliação de Segurança - Antigas Áreas Mineiras" contém um relatório sobre este inventário e identifica 133 áreas mineiras que necessitam deste tipo de intervenção, fazendo parte delas a mina de Regoufe, inserida no grupo do Estanho e Tungsténio. No entanto, ainda não foi desenvolvido qualquer plano de recuperação ambiental para a mesma (Sousa, 2016).

Os projetos de recuperação ambiental de áreas mineiras abandonadas são de extrema importância, contudo a sua execução é muitas vezes impraticável devido aos seus custos elevados. No entanto, devem ser adotadas medidas de salvaguarda do ambiente, como por exemplo:

- Cobertura e impermeabilização dos solos contaminados;
- Diluição de terrenos com solo proveniente de outros locais não contaminados;
- Adição de corretivos de modo a minimizar a mobilidade e biodisponibilidade dos contaminantes;
- Restauração de ecossistemas através da reintrodução de espécies nativas;
- Uso de plantas para remoção ou estabilização dos contaminantes existentes no solo;
- Monitorização ambiental de modo a avaliar a eficácia das medidas de remediação e facilitar na identificação das áreas críticas que requerem intervenção adicional.

De entre as muitas abordagens da reparação física/química, fito/biorremediação e reparação integrada de solos contaminados por metais pesados (Liu et al., 2018) a fitorremediação é uma das técnicas operacionalmente mais simples, eficaz, economicamente viável, ambientalmente sustentável e amplamente aceite (Bhat et al., 2022; Sabreena et al., 2022).

A fitorremediação, combinação de duas palavras: grego *phyto* (que significa planta) e latim *remedium* (que significa corrigir ou remover um mal), consiste no uso de plantas para reduzir, remover, degradar ou imobilizar contaminantes orgânicos e/ou inorgânicos, principalmente de origem antropogénica, com o objetivo de restaurar áreas contaminadas (Mukhopadhyay & Maiti, 2010). Além disso, a fitorremediação parece beneficiar a estabilização do solo, a produção de biomassa/biocombustível e o sequestro de carbono, melhorando assim a utilidade e a fertilidade do solo (Ali et al., 2013). No que concerne áreas mineiras, é descrita como particularmente eficaz no

tratamento de grandes áreas de rejeitos mineiros com contaminação superficial de poluentes orgânicos, nutrientes e metais (Wang et al., 2017).

As técnicas de fitoremediação podem ser distinguidas em função das diferentes propriedades das plantas (Ali et al., 2013), nomeadamente:

- Fitoextração – na qual plantas são utilizadas para absorver contaminantes ou metais através das suas raízes. Este tipo de extração pode ser realizado através da acumulação, ou hiperacumulação, de metais na biomassa vegetal acima do solo;
- Fitoestabilização – na qual plantas são utilizadas para estabilização/imobilização de contaminantes em solos contaminados. Esta técnica limita a mobilidade e a biodisponibilidade dos poluentes no solo pelas raízes das plantas;
- Fitovolatilização – na qual plantas são utilizadas para absorção dos poluentes no solo, respetiva conversão para a forma volátil e subsequente libertação dos mesmos para a atmosfera;
- Fitofiltração – na qual plantas são utilizadas para sequestro de poluentes de águas superficiais contaminadas;
- Fitodegradação – na qual plantas são utilizadas para degradação de poluentes orgânicos com ajuda de enzimas vegetais e suas atividades metabólicas;
- Rizodegradação – na qual se recorre a microrganismos na rizosfera para decomposição de poluentes orgânicos no solo;
- Fitodessalinização – na qual plantas halófitas são utilizadas para remoção de sais em solos altamente salinos.

Das plantas adequadas para a fitoremediação destacam-se dois grupos (com base na sua função): hiperacumuladoras de metais e produtoras de biomassa. As plantas produtoras de biomassa incluem plantas que têm uma elevada produção de biomassa e taxa de crescimento, mas uma capacidade relativamente baixa de absorção de metais, ao passo que as plantas conhecidas como hiperacumuladoras de metais apresentam níveis mais elevados de absorção de iões metálicos nos seus tecidos, mas produzem frequentemente menor quantidade de biomassa e desenvolvem-se mais lentamente (Wang et al., 2017).

Uma das questões que se coloca relacionada ao uso de plantas para remediação da contaminação do solo no presente estudo prende-se com a possível translocação dos contaminantes para o pólen, até porque se considera o pólen mais sensível aos poluentes do que as partes vegetativas das plantas (Muradoglu et al., 2017).

O grão de pólen corresponde ao gametófito masculino das plantas superiores com semente, sendo fundamental no processo de reprodução sexuada das plantas. A sua formação ocorre nas anteras, estruturas especializadas da flor que quando sofrem deiscência libertam o pólen maduro que depois é transportado até ao estigma da mesma ou de outra flor (polinização). Ao alcançarem os óvulos de uma flor da mesma espécie, ocorre a fecundação da oosfera e conseqüente desenvolvimento de frutos e sementes.

A composição química do pólen é muito diversificada e rica em substâncias biologicamente ativas. Técnicas analíticas avançadas de cromatografia e espectrometria, aplicada ao pólen recolhido por abelhas, permitiram a identificação de cerca de 200 substâncias distintas nos grãos de pólen, dependendo das espécies polínicas analisadas. Como constituintes base da composição química do pólen destacam-se as proteínas, os aminoácidos, os hidratos de carbono, os lípidos e os ácidos gordos, os compostos fenólicos, as enzimas, as vitaminas e os bioelementos (Campos et al., 2008). Por apresentar na sua constituição aminoácidos essenciais necessários ao organismo humano, o pólen de abelha é até considerado como o "único alimento perfeitamente completo" (Feás et al., 2012).

De entre os elementos existentes, o pólen inclui macronutrientes, como é o caso do cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), e micronutrientes como o ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), silício (Si) e selénio (Se) (Campos et al., 2008; Komosinska-Vassev et al., 2015), alguns dos quais fazem parte da lista de EPT, nomeadamente Cu, o Zn e o Mn. Em concentrações necessárias estes elementos não apresentam qualquer risco para o pólen, mas quando excedem as concentrações essenciais podem causar alterações nas funções do mesmo (Sawidis & Reiss, 1995). Assim, é importante ter em conta que a composição do pólen e as concentrações de EPT no pólen variam de acordo com vários fatores, tais como espécie de plantas, origem geográfica ou condições climáticas (Feás et al., 2012; Nogueira et al., 2012).

Como resultado do processo de polinização, realizado por agentes abióticos através de fatores ambientais (vento, água, gravidade), elevadas quantidades de pólen são libertadas para a atmosfera, tornando-se parte do aerossol atmosférico capaz de entrar nas vias respiratórias e provocar reações alérgicas respiratórias em indivíduos suscetíveis (Ribeiro & Abreu, 2014). Estas reações alérgicas provêm de proteínas específicas presentes na parte interna do pólen (intina e citoplasma), assim como na parede externa do mesmo (exina) (Cresti & Linskens, 2000) que têm um papel de alérgénio capaz de provocar o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade tipo I. Este tipo de reação, mais frequentemente observada na alergia ao pólen, é

desenvolvida quando o alergénio estimula o organismo a produzir anticorpos específicos pertencentes à classe E de imunoglobulinas (IgE) (Puc, 2003). Assim, a resposta alérgica desenvolve-se quando o mecanismo natural de defesa imunitária é perturbado.

Apesar da polinose (processo que descreve a reação imunológica relacionada com pólen) ser um problema sazonal, uma vez que os grãos de pólen são libertados para a atmosfera durante a época de floração das próprias plantas (Ribeiro & Abreu, 2014), é sobretudo um problema de saúde que afeta, de um modo geral, a qualidade de vida dos indivíduos por todo o mundo (Ring et al., 2012).

Deste modo, caso o pólen das plantas situadas em solos que apresentem contaminação, acumulem EPT em concentrações elevadas, poderá apresentar um risco para a saúde humana uma vez que a população localizada nas imediações da zona mineira poderá ser exposta, por inalação a estes elementos potencialmente tóxicos.

Para melhor entender esta possível problemática, neste presente estudo, pretendeu-se avaliar o pólen e as plantas situadas na área mineira de Regoufe, a fim de investigar se as amostras apresentavam sinais de bioacumulação de EPT existentes na área e como as características específicas do solo poderão influenciar este padrão de acumulação. Foi ainda avaliada algumas propriedades do pólen.

## Capítulo 3

---

### Enquadramento da área de estudo

### 3. Enquadramento da área de estudo

#### 3.1. Enquadramento geográfico

O presente estudo decorreu na zona mineira de Regoufe [figura 1], localizada na proximidade da povoação de Regoufe, freguesia de Covelo de Paivô pertencente ao concelho de Arouca, distrito de Aveiro. Regoufe situa-se no norte de Portugal Continental, mais precisamente, entre as províncias do Douro Litoral e da Beira Alta. O acesso às instalações mineiras é facilitado por estradas nacionais, municipais e/ou florestais.



Figura 1 - Complexo mineiro de Regoufe, Arouca.

Na Carta Militar de Portugal 1:25000, publicada pelo Centro de Informação Geoespacial do Exército, esta região encontra-se posicionada nas folhas 155 e 156, estando também cartografada na Carta Geológica de Portugal, à escala de 1:50000, no quadrante NE da folha 13-D (Oliveira de Azeméis) e numa pequena porção do quadrante NW da folha 14-C (Castro Daire).

#### 3.2. Enquadramento histórico da exploração mineira

A estruturação do complexo mineiro de Regoufe teve início em 1915, ano em que Gustave Thomas, cidadão francês, obteve alvará de exploração para a mina localizada junto à aldeia de Regoufe (Silva & Ribeiro, 2006). Por volta de 1922 as minas mais importantes de Regoufe receberam novas licenças sob o registo de cidadãos britânicos e franceses, no entanto, a criação da principal companhia mineira – Companhia Portuguesa de Minas (CPM) – só ocorreu em 1941, em plena Segunda Guerra Mundial.

Na altura a Companhia Portuguesa de Minas foi financiada e dirigida principalmente pelos britânicos, pelo que ficou conhecida por “Companhia Inglesa”.

Por ordem ministerial, em 1944, a exploração mineira foi interrompida, forçando o encerramento da própria mina dada a pressão política e posicionamento do governo português na guerra. Esta ação conduziu a um período de crise até janeiro de 1946, ano em que é retomada a exploração e exportação do minério (Silva & Ribeiro, 2006).

Apesar das técnicas de processamento do minério terem sido pouco desenvolvidas e mecanizadas, estima-se que as minas de Regoufe terão extraído cerca de 639000 toneladas de W e Sn, entre 1935 e 1951 (Moura, 2005).

A exploração na mina de Regoufe prolongou-se até à década de 70, embora com atividade e intensidade mais reduzidas, extinguindo-se o direito de exploração, em 1990, ao abrigo do Decreto-Lei nº 88/90, de 16 de março (Sousa, 2016; Fonseca, 2019) [figura 2].

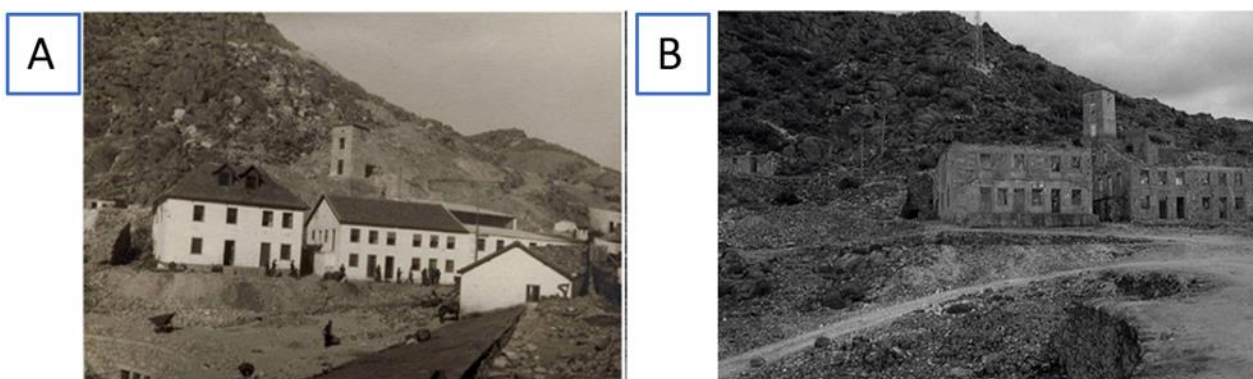


Figura 2 - Complexo mineiro de Regoufe no (A) período de funcionamento e (B) após encerramento das instalações (fonte: Mindat.org).

Desde então o complexo mineiro entrou numa situação de abandono e ruína progressiva e, como referido anteriormente, apesar de constar numa das áreas degradadas a reabilitar, este ainda não foi alvo de qualquer intervenção até à data.

A falta de segurança nas entradas das galerias assim como nas infraestruturas existentes na mina de Regoufe deve ser corrigida por meio de vedações de proteção. As águas provenientes das galerias ao correrem nas linhas de água mais próximas originam a contaminação das águas superficiais. A cobertura inadequada das escomboreiras facilita o transporte dos materiais finos pelo vento para as zonas próximas, em particular para a aldeia vizinha, onde a agricultura é o principal meio de subsistência da população local (Sousa, 2016).

### 3.3. Enquadramento geomorfológico

Geomorfologicamente, a área sobre a qual incide este estudo situa-se na Serra da Gralheira, também designada como maciço da Gralheira (Girão, 1922; Ribeiro et al., 1943; Favas, 2008), um complexo montanhoso, entre o rio Paiva e os rios Vouga e Sul, constituído não só por relevos acidentados e fortes declives da maioria das áreas da região, mas também topografias suaves e declives poucos acentuados [figura 3] como é o caso dos planaltos da Serra da Coelheira e Serra de São Macário. Nas encostas de um destes planaltos, a uma cota aproximada de 650 m, situa-se a aldeia de Regoufe (Tavares, 2006).

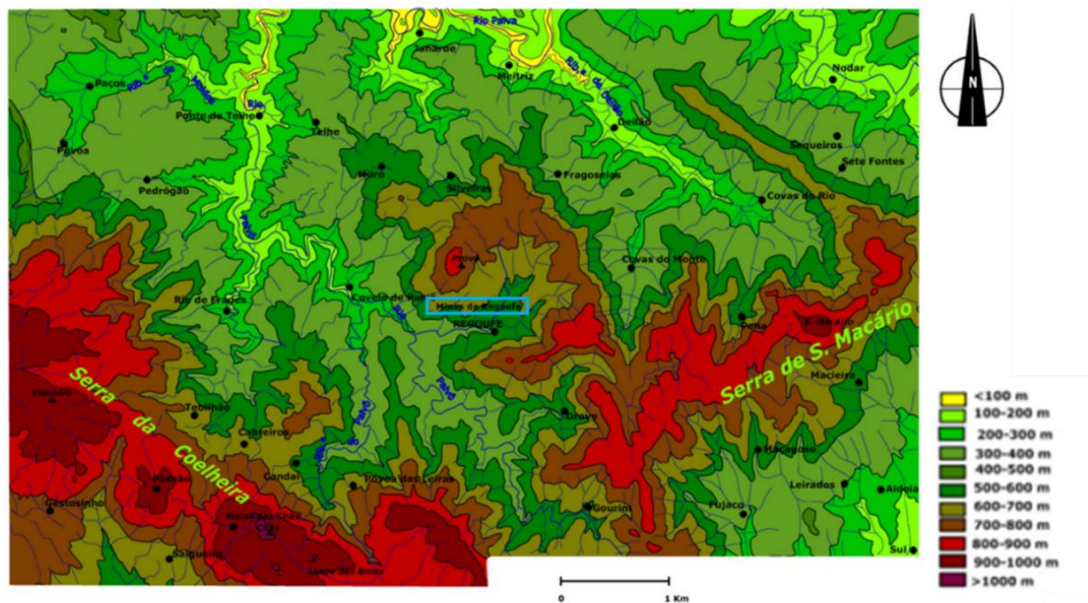


Figura 3 - Carta hipsométrica da região de Regoufe, com área de estudo representada com retângulo azul (retirado de Tavares, 2006).

Quanto à hidrografia da região, a rede de drenagem é densa e bem hierarquizada e os rios e ribeiros seguem, frequentemente, rotas sinuosas através de pequenos vales. O rio Paivô, afluente do Paiva, é particularmente significativo, uma vez que drena uma porção considerável da região, identificando-se outros cursos de água de menor extensão como o rio de Frades, os ribeiros de Drave, de Regoufe, de Paivô, da Pena Amarela, de Moldes (Tavares, 2006).

### 3.4. Enquadramento geológico

A mina de Regoufe faz parte da Zona Centro Ibérica (ZCI) (Sant'Ovaia et al., 2023). Esta zona é composta por duas megassequências, uma pré-ordovícica e outra pós-câmbrica, com datações que vão do Pré-câmbrico ao Devónico Inferior, todas elas formações

autóctones. As formações metassedimentares pré-ordovícicas, constituídas pelo Complexo Xisto-Grauváquico (CXG), afloram quase continuamente pelo Centro e Norte de Portugal, sendo estas as formações que predominam nesta zona (Carrington da Costa, 1950; Teixeira, 1955).

A área de Regoufe é caracterizada pela presença de rochas graníticas do Complexo Intrusivo de Regoufe, do qual faz parte o granito de Regoufe, e litologias correspondentes a metassedimentos do Complexo Xisto-Grauváquico ante ordovício (Tavares, 2006) [figura 4].

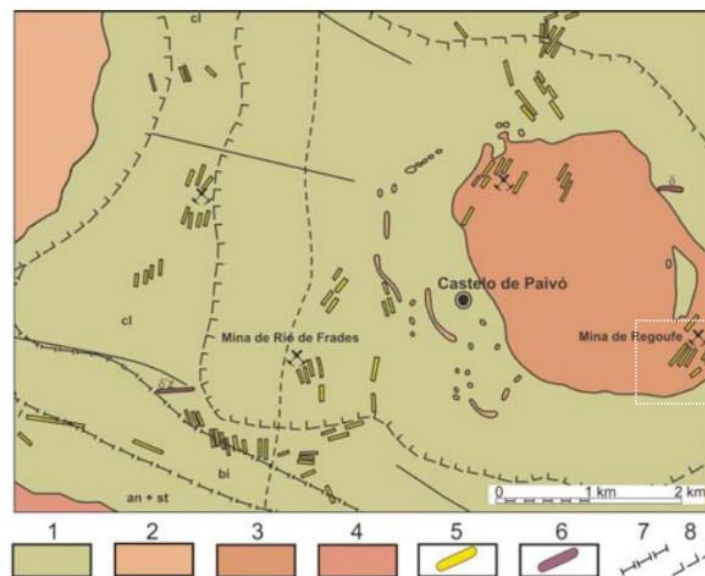


Figura 4 - Mapa geológico da região de Regoufe, com área de estudo simbolizada a tracejado (adaptado da Folha 13-D, Oliveira de Azeméis, da Carta Geológica de Portugal à escala 1:50000): 1 - Super Grupo Dúrico-Beirão; 2 - Quartzodiorito biotítico (Maciço de Arouca); 3 - Granito de Regoufe; 4 - Granito da Serra de Freita; 5 - Filões de quartzo; 6 - Doleritos (δ) e rochas básicas anfibolitizadas (δ'z); 7 - Isógrada de metamorfismo regional; 8 - Isógrada de metamorfismo de contacto (retirado de Sousa, 2016).

O granito de Regoufe, que tem uma idade estimada de  $280 \pm 8$  Ma (Pinto, 1985), constitui um pequeno plutão que se estende por uma distância de  $6 \text{ km}^2$ . Atualmente, e de acordo com o nível de erosão, o maciço granítico apresenta, segundo a direção NW-SE, uma forma ligeiramente elíptica (Sant'Ovaia et al., 2023).

Da área mineira de Regoufe faz parte o jazigo de W-Sn. A chamada "Província metalogénica tungsto-estanífera Ibérica" é definida pelos depósitos de W-Sn que se encontram na Península Ibérica, situados numa região que se estende desde a Galiza até ao Norte de Portugal e Oeste de Espanha (Noronha, 2006). De acordo com Noronha (2006) a formação destes jazigos está geograficamente associada a áreas onde houve a intrusão de granitos em séries marinhas, de idades compreendidas entre o Pré-

Câmbrico superior e o Silúrico, sendo, por isso, na ZCI onde ocorre a maior quantidade deste tipo de jazigos.

O depósito de minério W-Sn de Regoufe está instalado no bordo sudeste (SE) do maciço granítico de Regoufe (Durães et al., 2021). O granito de Regoufe apresenta numerosas diaclases, estando algumas delas preenchidas por filões de quartzo. Estes estão amplamente representados na zona quer no interior do plutão granítico, quer nos metassedimentos envolventes. A eles estão associadas as mineralizações de estanho e volfrâmio, outrora exploradas na mina de Regoufe (Tavares, 2006).

A mineralização de Regoufe é constituída sobretudo por volframite, mas também por cassiterite e sulfuretos, nomeadamente arsenopirite, pirite e esfalerite, ainda, por minerais silicatados, como o quartzo (presença dominante), alguma moscovite, berilo e apatite (Favas, 2008).

### 3.5. Tipo de solo

A Carta de Solos de Portugal 1:1000000, mostra que na área de Regoufe predominam os solos do tipo Cambissolos Úmbricos, por vezes associados a Luvisolos [figura 5]. A área mineira de Regoufe, situa-se sobretudo num afloramento granítico, ao passo que os campos agrícolas de Regoufe em solos xistentos. Na zona de Regoufe os solos caracterizam-se por (Favas, 2008):

- Horizonte A – relativamente espesso (mais de 10/30 cm), franco-arenoso ou vice-versa, com alto teor em matéria orgânica e frequentemente húmico;
- Horizonte B – franco-arenoso;
- Horizonte C – muito espesso, arenoso e assenta sobre a rocha-mãe (R).

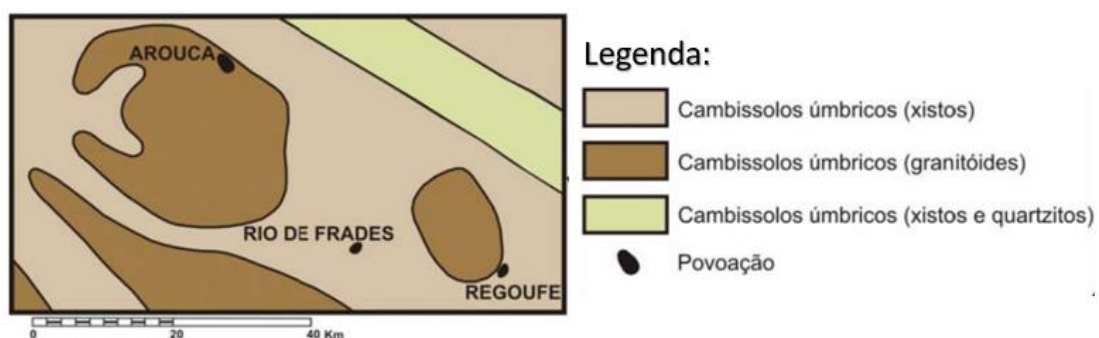


Figura 5 - Carta de solos simplificada da região envolvente à área de estudo (adaptada da Carta de Solos de Portugal à escala 1:1000000, 1971) (retirado de Favas, 2008).

### 3.6. Coberto vegetal

O coberto vegetal que contempla a zona mineira de Regoufe está fortemente correlacionado com o tipo de substrato presente, verificando-se escassez de vegetação nas zonas graníticas, contrariamente às zonas onde floram metassedimentos (Tavares, 2006).

A região enquadra-se num domínio fitogeográfico oro-atlântico, contudo com influência sub-atlântica e atlântica (Favas, 2008). Deste modo, através das influências oro-atlânticas associadas a altitudes elevadas e maior exposição a ventos húmidos marítimos, e das influências atlânticas, por sua vez dominantes no Noroeste do território nacional (Castro, 1996), verificam-se como principais espécies vegetais arbóreas (Favas, 2008):

- Carvalho alvarinho (*Quercus robur* L.) e sobreiro (*Quercus suber* L.) a uma cota inferior aos 500 metros;
- Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) e carvalho negral (*Quercus pyrenaica* Willd.) nas zonas de média altitude entre os 500 e 700 metros;
- Pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Aiton) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) até aos 800 metros de altitude em zonas onde não se realiza a agricultura.

No que diz respeito aos elementos arbustivo-arbóreos destaca-se o azevinho (*Ilex aquifolium* L.) e a sorveira (*Sorbus aucuparia* L.), sendo os matos dominados por elementos sub-arbustivos como urzes (*Erica australis* L., *Erica tetralix* L., *Erica arborea* L., *Erica umbellata* L., *Erica cinerea* L.), torga (*Calluna vulgaris* L.), tojos (*Ulex europaeus* L. e *Ulex minor* Roth), o sargaço (*Halimium allysoides* (Lam.) Spach), o mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), a carqueja (*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.) e a giesta piorneira (*Genista florida* L.) (Favas, 2008)

### 3.7. Caracterização climática

Relativamente ao clima, a área sobre a qual incide este estudo caracteriza-se pela existência de dois períodos climáticos distintos [figura 6] (Favas, 2008):

- Período húmido – meses de Setembro a Junho, com valores de precipitação máximos nos meses de Dezembro e Janeiro;
- Período seco – meses de Julho e Agosto, onde os valores de precipitação são inferiores a 25 mm.

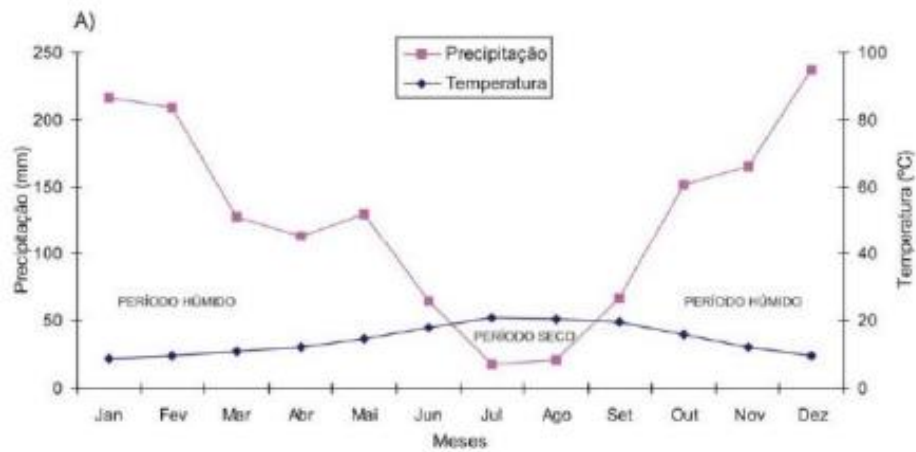


Figura 6 - Variações da precipitação e temperatura médias anuais, referentes ao período de 1965 a 1995 (estação climatológica de Arouca) (retirado de Favas, 2008).

O Geoparque de Arouca, à qual pertence a área em estudo, apresenta um clima mediterrânico temperado com influência atlântica, caracterizado por invernos chuvosos (precipitação média anual de 1212 mm) e verões quentes e curtos (temperatura média anual de 14 °C) (Sá & Rocha, 2020).

## Capítulo 4

---

### Material e métodos

## 4. Material e métodos

### 4.1. Amostragem

No complexo mineiro de Regoufe foi efetuada uma amostragem, no dia 29 de abril de 2022, na zona de vale, próximo das antigas infraestruturas da mina. Foram recolhidas amostras de solo e plantas em 5 diferentes locais [figura 7], que correspondem aos locais com valores de concentração extremos (máximos e mínimos) em termos de EPT do solo (Sant'Ovaia et al., 2023).

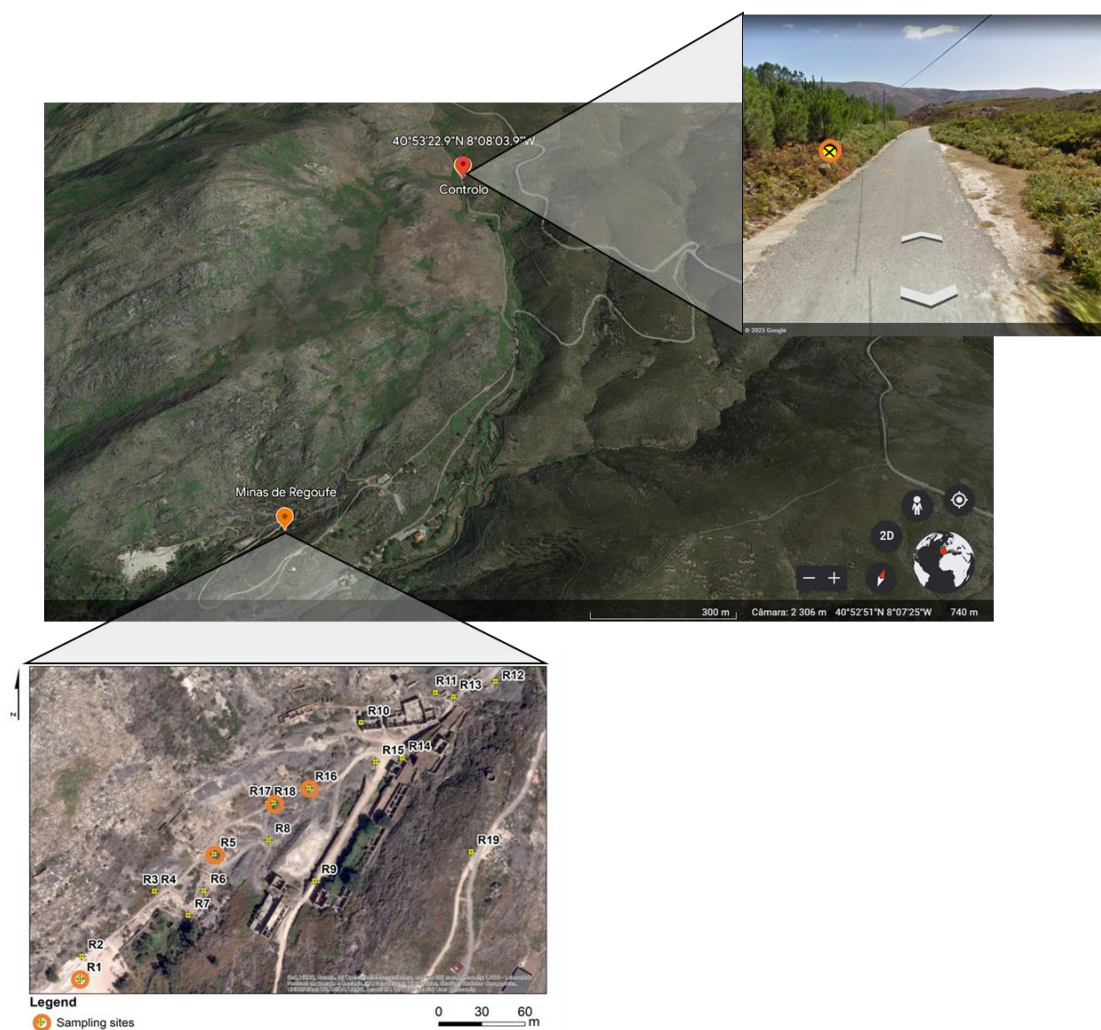


Figura 7 - Mapa com a localização dos 5 pontos amostrados, identificados a laranja, na zona mineira de Regoufe.

Relativamente às amostras de plantas, foram recolhidas duas espécies típicas da região, a *Erica arborea* L. e a *Calluna vulgaris* L. [figura 8]. Ambas foram colhidas na totalidade (raiz, caule, folha e flor) para sacos de papel. As espécies foram identificadas

taxonomicamente com base na flora Portuguesa de Gonalo Sampaio. Uma vez que, para se recolher p3len em quantidade suficiente para an3lise a planta necessita de estar no pico de emiss3o pol3nica durante a 3poca de flora3o, apenas foi poss3vel recolher de *Erica arborea* L.



Figura 8 - Plantas amostradas (A) esp3cie *Erica arborea* L. (B) esp3cie *Calluna vulgaris* L. .

O solo foi recolhido, ap3s remo3o da cobertura vegetal (cerca de 5 cm), usando uma p3 de pl3stico e armazenado num saco de pl3stico.

Posteriormente, procedeu-se 3 an3lise laboratorial das amostras para determinar a sua composi3o qu3mica e os par3metros relacionados 3s propriedades do p3len e do solo.

A tabela 1 exibe, mais detalhadamente, a designa3o de cada amostra, bem como, observa3es consideradas pertinentes sobre cada local.

Tabela 1 - Informa3o detalhada sobre os locais de amostragem na zona mineira de Regoufe.

| Local | ID         | Observa3es                                                                                                               |
|-------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RC    | Controlo   | Amostra recolhida na berma da estrada. Sob a mesma influ4ncia geoqu3mica da regi3o mas sem interfer4ncia mineira.         |
| R1    | R1         | Antiga zona de rejeitos mineiros                                                                                          |
| R5    | Lavaria    | Nas instala3es onde se realizava a lavagem do min3rio. No local ainda se encontra uma estrutura da lavaria j3 degradada. |
| R16   | Galeria    | Perto da entrada de uma galeria mineira de onde sai um curso de 3gua.                                                     |
| R18   | Perto 3gua | Mais 3 frente de R16, junto de uma linha de 3gua.                                                                         |

## 4.2. Processamento e análise das amostras

### 4.2.1. Solos

Para remoção do excesso de humidade, as amostras de solos foram, inicialmente, colocadas a secar numa estufa à temperatura de 40°C. Após secagem, cada amostra foi desagregada, homogeneizada e quartilhada em duas sub-amostras. Seguiu-se uma crivagem a 2 mm, através de um agitador mecânico de peneiros, para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA).

#### 4.2.1.1. Determinação do pH

O pH das diferentes amostras de solo foi determinado de acordo com a metodologia adotada na norma ISO 10390:2006, numa solução do solo em água desionizada com uma proporção de 1:5 (V/V). Deste modo, foram adicionados 8 mL de TFSA de cada amostra e 40 mL de água desionizada em frascos de vidro devidamente identificados e posteriormente agitados por 1 hora, seguidos de 1 hora de repouso. Após o tempo de espera, transferiu-se o sobrenadante para tubos de *Falcon*, e recorrendo ao medidor da *Hanna Instruments HI 2210*, os valores de pH foram obtidos em triplicado.

#### 4.2.1.2. Determinação da condutividade elétrica

A condutividade elétrica das amostras de solo foi determinada de acordo com a norma ISO 11265:1994, numa suspensão de solo em água desionizada com uma proporção de 1:5. Foram adicionados 8 mL de TFSA de cada amostra e 40 mL de água desionizada em frascos de vidro posteriormente agitados por um período de 60 minutos seguidos de 1 hora de repouso. Em seguida, filtrou-se o líquido sobrenadante que foi depois transferido para tubos de *Falcon* e recorrendo ao condutímetro *Crison GLP 31*, os valores de condutividade elétrica foram medidos em triplicado.

#### 4.2.1.3. Determinação do teor de matéria orgânica

Para determinação do teor de matéria orgânica do solo, utilizou-se o método de pedra ao rubro. Para isso, foram pesados 2,5 g de TFSA de cada amostra para cadinhos de porcelana [figura 9], previamente condicionados numa estufa a 105°C. Estas amostras foram colocadas a 105°C por um período de 24h, para remoção total da humidade. No dia seguinte, os cadinhos foram colocados numa mufla programada para atingir 100°C (5°C por minuto) e permanecer durante 15 minutos, aumento em seguida para os 550°C (5°C por minuto) e permanecendo a essa temperatura durante 3h. Posteriormente,

deixou-se arrefecer até atingir a temperatura ambiente e foi calculado o teor de matéria orgânica através do diferencial da massa de solo antes e após queima ao rubro.

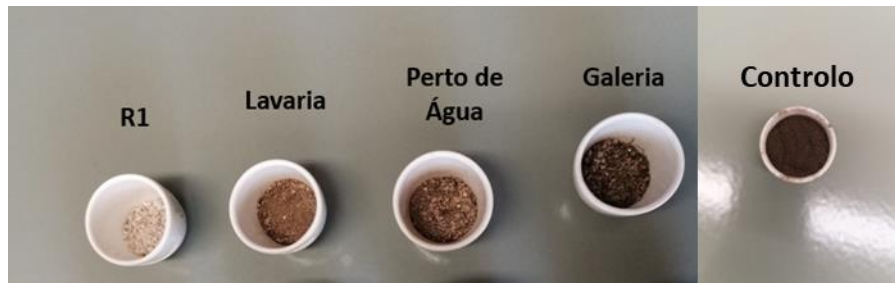


Figura 9 - Porção dos solos amostrados nos cadinhos.

#### 4.2.1.4. Composição química

A determinação da concentração de EPT (As, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd e Co) nas amostras de solo, foi efetuada por ICP-MS foi realizada nos Laboratórios Analíticos ACME (Vancouver, BVC, Canadá), utilizando o método de digestão de quatro ácidos para análise ICP-MS Ultratrace. As amostras foram moídas a 125  $\mu$ m num almofariz de ágata e um peso de amostra de 0,25 g foi aquecido até à fumagem numa mistura tri-ácida ( $\text{HF-HClO}_4\text{-HNO}_3$ ), seguindo-se secura. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em HCl. As soluções resultantes foram, então, analisadas por ICP-MS e os resultados analíticos dos materiais de referência certificados (STD OREAS45H e STD OREAS501D), os ensaios em branco e as amostras duplicadas aleatórias foram utilizados para o controlo de qualidade do procedimento analítico.

#### 4.2.2. Plantas

Relativamente às amostras de plantas, no laboratório estas foram separadas em flores, folhas, caule e raízes, e lavadas abundantemente em água desionizada. Em seguida, foram dispostas em tabuleiros e colocadas numa estufa a secar à temperatura máxima de 65°C, até à obtenção de massa constante. Após este procedimento, as amostras foram congeladas e fraturadas até uma dimensão < 1mm, utilizando um martelo.

##### 4.2.2.1. Composição química

A determinação da concentração de EPT (As, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd e Co) nos diferentes órgãos (raiz, caule, folhas e flores) das plantas de *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. foi realizada no Activation Laboratories Ltd. (Actlabs) (Ancaster, Ontario, Canadá), utilizando o método de digestão de aqua regia para análise ICP-MS. As

amostras foram digeridas numa mistura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$ , seguindo-se a digestão num equipamento de micro-ondas. Em seguida, foi realizada a filtração das amostras com um filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ . As soluções resultantes foram analisadas por ICP-MS e os resultados analíticos dos materiais de referência certificados (CLV-1, CLV-2, CDV-1), os ensaios em branco e as amostras duplicadas aleatórias foram utilizados para o controlo de qualidade do procedimento analítico.

O método ICP-MS proporciona a deteção da maioria dos elementos da tabela periódica com base na ionização dos elementos constituintes da amostra em estudo. Os equipamentos mais modernos oferecem gamas com ordens de grandeza que permitem uma análise simultânea dos elementos maiores, menores e vestigiais. Nesta técnica, as amostras sólidas são sujeitas a um pré-tratamento de dissolução em líquido, conseguida através de uma digestão ácida. Em seguida é utilizado um plasma de alta temperatura que decompõe os compostos químicos das amostras nos seus respetivos iões atómicos, sendo estes, depois, detetados e quantificados pela espectrometria de massa ([www.measurlabs.com](http://www.measurlabs.com)).

Neste ponto foi ainda testada a potencialidade da utilização de um espectrómetro portátil de fluorescência de raios-X (XRF) na determinação da composição química das plantas.

O XRF é uma técnica analítica que deteta e mede a maioria dos elementos da tabela periódica permitindo, assim, uma rápida análise elementar de uma vasta gama de materiais através da medição de raio-X fluorescente. Mais pormenorizadamente, quando os átomos de uma amostra são atingidos por uma radiação de alta energia, estes sofrem excitação que faz com que os eletrões das orbitais mais internas sejam expulsos. Quando o átomo recupera a estabilidade, ou seja, os eletrões de maior energia ocupam as orbitais internas, os eletrões caem para um estado de menor energia que provoca a emissão de uma radiação fluorescente de raio-X [figura 10], a energia desses raios é depois representada graficamente em picos de intensidade variáveis ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

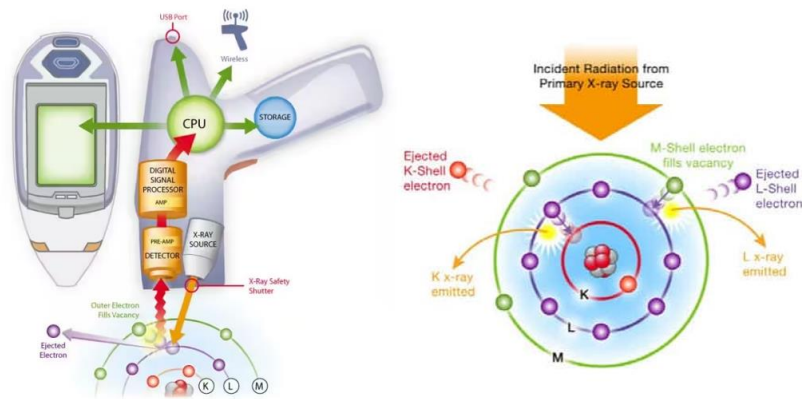


Figura 10 - Imagem ilustrativa do processo de fluorescência de raio-X (fonte: (fonte: ThermoFisher Scientific).

Dado que cada um dos elementos presentes numa amostra produz um conjunto de raios-X fluorescentes característicos, estes são considerados como uma espécie de “impressão digital” que, por sua vez, permite a sua identificação visto que a energia do pico identifica o elemento presente e a sua altura/intensidade indica a respetiva concentração. De notar que, contrariamente ao ICP-MS, o XRF portátil é uma técnica não destrutiva da amostra, podendo esta ser reaproveitada para outras análises.

Na utilização do XRF na quantificação elementar, as amostras das plantas de *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. foram colocadas em caixas próprias de medição do equipamento e colocadas no compartimento de medição [figura 11]. Todas as amostras foram analisadas em 2 métodos de medição: “soil” e “mining”, tendo sido efetuada para cada amostra 3 medições. À variável densidade do pólen atribui-se o valor de  $1 \text{ g/cm}^3$ , tendo a variável espessura sido obtida por meio de medição com uma régua. Os dados obtidos foram depois recolhidos no computador e analisados.

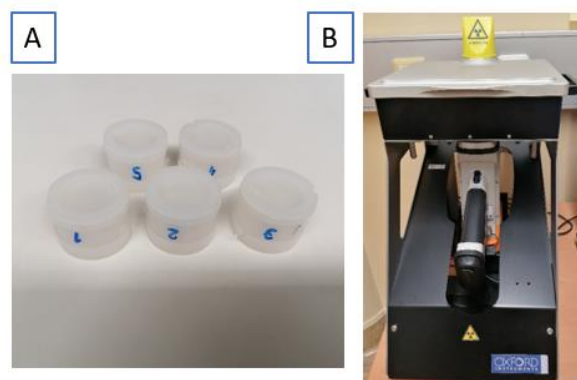


Figura 11 - Materiais utilizados para determinação composição química das plantas: (A) caixas de medição com as respetivas amostras, (B) Espectrómetro portátil de raio-X (XMET 7000).

### 4.2.3. Pólen

As inflorescências da espécie *Erica arborea* L. , coletadas no pico da época de floração, foram colocadas na estufa à temperatura constante de 25°C por um período de 24h, de modo a potenciar a finalização da deiscência das anteras. Após este período, procedeu-se à obtenção de pólen através de peneiração. As inflorescências foram colocadas num conjunto de crivos (150 µm e 63 µm) e a separação do pólen foi efetuada recorrendo a um agitador mecânico. O pólen puro recolhido foi transferido para tubos de *Eppendorf* 1,5 mL, previamente identificados, e armazenados a -20°C.

#### 4.2.3.1. Fertilidade polínica

A fertilidade polínica foi analisada por meio de ensaios de germinação em condições *in vitro*, recorrendo a um meio de germinação otimizado para a espécie *Arbutus unedo* L. que pertence à família das *Ericaceae* tal como a espécie em estudo (*Erica arborea* L.).

Cada amostra de pólen foi incubado em placas de petri contendo um meio de germinação sólido constituído por: 5 mg/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 15 mg/L de CaCl<sub>2</sub>, 10 mg/L de KNO<sub>3</sub>, 15% de sacarose e 1% de agar (Martins et al., 2021), durante 24h a 25°C na obscuridade. A taxa de germinação do pólen foi determinada através da quantificação microscópica do número de tubos polínicos em 3 secções aleatórias, contabilizando 100 grãos de pólen por cada secção. Foram efetuadas 5 réplicas por local de amostragem.

Uma vez que os grãos de pólen de *E. arborea* L. estão organizados em tétradas (Mateus, 1989) [figura 12], o pólen foi considerado germinado quando o tubo polínico de, pelo menos, um grão de pólen da tétrada apresentava comprimento superior ao diâmetro do respetivo grão de pólen [figura 13].

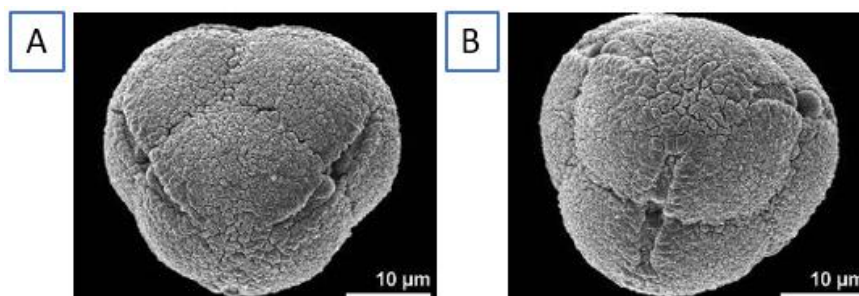


Figura 12 - (A) e (B) Tétradas do pólen de *Erica arborea* L. (fonte: PalDat - Palynological Database).

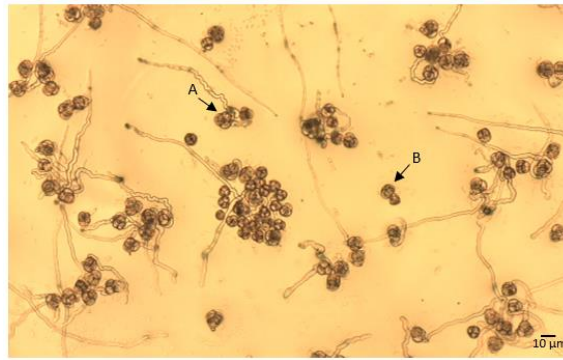


Figura 13 - Pólen da espécie *Erica arborea* L.: (A) germinado e (B) não germinado, observado ao microscópio (10x).

#### 4.2.3.2. Extração e quantificação do conteúdo proteico solúvel

Em tubos de 2 mL foram adicionados 30 mg de *beads* de zircónia (0,1 mm), 25 mg das amostras de pólen de *Erica arborea* L. e 500 µL de solução tampão de extração PBS (pH 7.4), realizando-se 3 réplicas por amostra. O homogeneizado resultante foi depois agitado no *bead better* a 4000 rpm (3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 15 segundos por ciclo), seguindo-se agitação orbital dos tubos por um período de 2h a 4°C e duas centrifugações sucessivas de 4600 rpm durante 20 minutos, também a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram em seguida transferidos para novos tubos e filtrados com uma seringa e filtro de 0,45 µm (um filtro por amostra) e sujeitos a nova centrifugação nas condições anteriormente descritas (Pereira et al., 2021).

Posteriormente, procedeu-se à quantificação do conteúdo proteico solúvel dos extratos de pólen pelo método de Bradford que se baseia no uso do corante *Coomassie* para obtenção de uma reação colorimétrica com a proteína existente nos extratos de pólen (Bradford, 1976).

Realizou-se então a diluição das amostras a 10xs e pipetou-se a amostra e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* numa proporção de 33:990 µL, realizando uma amostra de branco constituída apenas por tampão de extração PBS e corante *Coomassie*, também. Em seguida, foi efetuada a quantificação da concentração (µg/mL) de proteína solúvel em microplacas (300 µL por poço) a uma absorvância de 595 nm.

#### 4.2.3.3. Estudo do perfil proteico polínico por SDS-PAGE

O estudo do perfil proteico polínico foi conseguido através da técnica de SDS-PAGE, que tem como objetivo a separação das proteínas segundo o seu peso molecular.

De acordo com Laemmli (1970), em primeiro lugar efetuou-se a preparação do sistema de suporte de géis, bem como a preparação do gel separador e concentrador. Em seguida, pipetou-se a solução do gel separador adicionando, logo de seguida, água sobre o mesmo para reduzir o contacto do respetivo gel com  $O_2$  uma vez que este pode inibir a polimerização. Após 20 minutos de espera, a água foi retirada e foram colocados, no suporte, pentes que permitiram a criação de poços das amostras, seguindo-se a rápida pipetagem do gel concentrador que, contrariamente, ao anterior polimeriza na presença de  $O_2$ .

No dia seguinte, preparou-se o suporte de eletroforese e colocou-se o tampão de eletroforese, seguindo-se a pipetagem das quantidades pré-determinadas do marcador, do controlo e dos extratos de pólen, previamente adicionadas ao agente redutor mercaptoetanol, desnaturadas por aquecimento a  $100^\circ C$  (5 minutos) e centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos e meio. Depois, deu-se início ao processo da corrida do gel através da ligação do suporte à fonte de corrente. Finalizada a migração retiraram-se, cuidadosamente, os géis, tendo estes sido revelados após incubação à temperatura ambiente, na obscuridade e em agitação, nas soluções de fixação (30 minutos), coloração (30 minutos) e descoloração (substituída de 20 em 20 minutos).

Após descoloração total, foram identificadas as bandas proteicas originadas de cada local, assim como o seu respetivo peso molecular utilizando o software “Image Lab” da BioRad.

#### 4.2.3.4. Microspectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica altamente sensível que fornece quer informações químicas, quer estruturais de amostras através da identificação, resultante de espectros únicos que funcionam como uma “impressão digital”, das substâncias existentes.

Este tipo de espectroscopia envolve o estudo de alterações na luz monocromática (laser) à medida que esta interage com a amostra em estudo, ou seja, uma luz laser de alta intensidade ao incidir na amostra faz com que a energia do fotão seja transferida para moléculas da amostra. Contudo, este não é um evento estável, o que faz com que o fotão seja reemitido, quase imediatamente, sob a forma de luz dispersa. Após a interação com o fotão, na maior parte das ocorrências de dispersão, a energia da molécula não se altera e, conseqüentemente, o comprimento de onda é igual ao do fotão incidente (dispersão de Rayleigh), contudo, num episódio mais raro, ocorre a dispersão inelástica com transferência de energia entre a molécula e o fotão disperso (dispersão

Raman), verificando-se diferentes comprimentos de onda que dependem da estrutura química da substância a analisar [figura 14]. Daqui resultam espectros Raman, que apresentam uma série de picos que mostram a intensidade e a posição do comprimento de onda da luz Raman dispersa, proporcionando impressão digital através da qual a molécula pode ser identificada ([www.edinst.com](http://www.edinst.com)). Este é um método não destrutivo e aplicado diretamente sobre a amostra, não sendo necessária a preparação prévia da mesma.

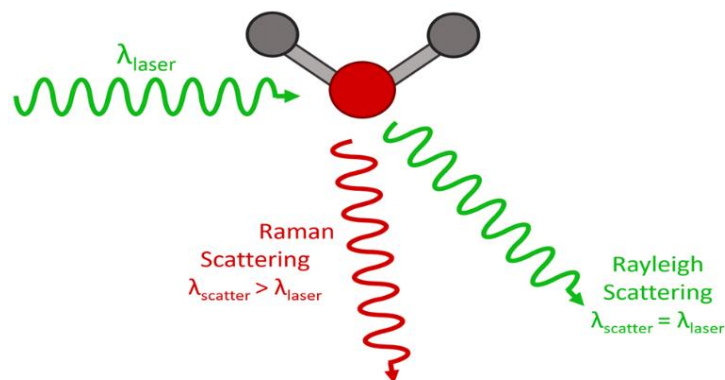


Figura 14 - Imagem ilustrativa do princípio Raman (fonte: Blog Edinburgh Instruments).

Os espectros Raman do pólen contêm sinais específicos de macronutrientes, como lípidos, proteínas, hidratos de carbono, água e mesmo certos pigmentos, que fornecem informações sobre a caracterização química do pólen (Schulte et al., 2008; Pummer et al., 2013; Kendel & Zimmermann, 2020; Węglińska et al., 2020; Pereira et al., 2021). Esta composição química complexa é determinante na resiliência e resistência dos grãos de pólen aos fatores abióticos (Pereira et al., 2021). Assim, diferenças em espectros obtidos para amostras da mesma espécie de pólen refletem diferenças na estrutura química da parede do respetivo pólen alteradas por fatores externos, como o caso da contaminação do solo e da planta.

A aquisição dos espectros neste estudo foi feita recorrendo ao microscópio *XploRA™ Raman Horiba Scientific* que combina microscopia ótica com uma espectroscopia Raman utilizando a radiação laser. Inicialmente foi realizada a calibração do equipamento com uma amostra padrão de silício ( $520.6 \pm 0.1 \text{ cm}^{-1}$ ). Em seguida as amostras de pólen foram colocadas, em lâminas de vidro e, com a lente objetiva de 100x, foi realizada a focagem do feixe laser na amostra a ser analisada. Para cada espécie foram recolhidos 4 espectros em cada um dos 20 grãos de pólen selecionados aleatoriamente, com um comprimento de onda de 785 nm de um laser de diodo a uma potência de 25 mW. Foram efetuadas 5 aquisições de 100 segundos em cada grão de

pólen, numa região espectral de 1000 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de aproximadamente 1  $\text{cm}^{-1}$  (Pereira et al., 2021).

Para processamento dos espectros recorreu-se aos softwares *Labspec* e *KnowItAll*®, nos quais os espectros foram alvos de uma correção polinomial automática da linha de base, para atenuação da influência da fluorescência, seguindo-se um corte dos mesmos para numa região espectral de 1080 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Depois foi efetuada uma média dos 4 espectros de cada grão de pólen e uma normalização para uma área constante (100 a.u.) e um “*smooth*” para redução do ruído, melhorando a qualidade dos espectros. Por fim, cada espectro sofreu deconvolução utilizando um procedimento misto de ajuste de curvas Gaussianas-Lorentzianas para determinação de parâmetros Raman, nomeadamente intensidade do pico, largura a meia altura e área total do mesmo, para ver se existiam alterações visíveis nas diferentes regiões.

#### 4.2.3.5. Composição química

Assim como nas plantas, a determinação da composição química do pólen de *Erica arborea* L. foi efetuada por ICP-MS e testou-se a utilização de um espectrómetro portátil de raio-X (XRF) para análise.

Na análise por ICP-MS, as amostras de pólen foram digeridas numa mistura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$ , seguindo-se a digestão num equipamento de micro-ondas de modo a obter a completa dissolução da fração sólida. Depois foi realizada a filtração das amostras com um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (um filtro por amostra) e estas foram posteriormente analisadas por ICP-MS no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

### 4.3. Análise estatística

A fim de determinar se existiam variações estatisticamente significativas entres os valores médios obtidos nas diversas análises realizadas, foram efetuadas análises de variâncias, ANOVA ( $p < 0,05$ ), seguindo-se um teste post-hoc de Duncan. Foi ainda efetuada uma análise de correlação de *Spearman*, para verificar a correlação entre as propriedades do solo, das plantas e do pólen de *Erica arborea* L. Por fim, uma análise *Cluster* (classificação hierárquica) que permite agrupar os dados, de acordo com o grau de “proximidade” ou “parentesco”, identificando grupos homogéneos. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao software *IBM SPSS Statistics 27.0*.

## Capítulo 5

---

### Apresentação dos resultados

## 5. Resultados

### 5.1. Solos

#### 5.1.1. Propriedades físico-químicas

A tabela 2 exibe os resultados das análises ao pH, condutividade elétrica e matéria orgânica parâmetros físico-químicos realizados para as diferentes amostras de solos.

Tabela 2 - Valores de pH, condutividade elétrica e matéria orgânica das amostras de solo recolhidos na zona mineira de Regoufe.

| Amostra             | pH<br>(adimensional) | Condutividade<br>Elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) | Teor em Matéria<br>Orgânica (%) |
|---------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Controlo (RC)       | $5,4 \pm 0,00$       | $108,43 \pm 0,80$                                     | $20,54 \pm 0,08$                |
| Lavaria (R5)        | $5,7 \pm 0,06$       | $117,97 \pm 2,74$                                     | $6,92 \pm 0,22$                 |
| Galeria (R16)       | $5,4 \pm 0,06$       | $127,87 \pm 1,18$                                     | $4,75 \pm 0,03$                 |
| R1                  | $5,4 \pm 0,06$       | $82,17 \pm 2,24$                                      | $0,47 \pm 0,04$                 |
| Perto de água (R18) | $5,3 \pm 0,06$       | $93,17 \pm 1,42$                                      | $6,76 \pm 0,21$                 |

Dos resultados obtidos, verifica-se que os parâmetros condutividade elétrica e teor de matéria orgânica são os que exibem maior variabilidade entre os diferentes locais de amostragem, comparativamente ao pH.

Os valores de pH variam entre 5,3 (Perto de água) e 5,7 (Lavaria), observando-se que os solos de todos os locais amostrados se enquadram, de acordo com a escala de Pratolongo, na categoria dos solos ácidos (Costa, 2004), sendo o pertencente à Lavaria considerado menos ácido em comparação aos restantes.

Relativamente à condutividade elétrica, fortemente correlacionada com a granulometria e concentração de matéria orgânica do solo (Lund et al., 1999), os valores variam entre 82,17 e 127,87  $\mu\text{S}/\text{cm}$  nos locais de amostragem R1 e Galeria, respetivamente. De acordo com a classe de salinidade (Soil Science Division Staff, 2017) as amostras de solo apresentam valores muito baixos de condutividade elétrica.

No que diz respeito à matéria orgânica, observa-se que as amostras de solo apresentam um teor máximo de 20% no local Controlo, e um teor mínimo, que não chega a 1%, no local R1.

A cor escura dos solos tem sido associada a um elevado teor de matéria orgânica (Schulze et al., 1993). Os valores de matéria orgânica vão de encontro à figura 10, onde o solo com maior percentagem de matéria orgânica corresponde ao solo com tonalidade mais escura (Controlo), em oposição ao solo com menor percentagem de matéria orgânica, cujo solo apresenta, notoriamente, uma tonalidade mais clara (R1).

### 5.1.2. Composição química

Na tabela 3 são apresentados os teores dos EPT em estudo obtidos por ICP-MS, determinados nas amostras de solo, assim como os valores de referência mundial para solos (Kabata-Pendias, 2010).

Tabela 3 - Concentração de elementos potencialmente tóxica - EPT (mg/kg) medida nas amostras de solo. Para cada elemento, os valores mais elevados são destacados a negrito e os mais baixos a itálico. Valores obtidos por ICP-MS (VR – valores de referência mundial para solos não contaminados (Kabata-Pendias, 2010)).

| Local             | Elementos analisados (ppm = mg/kg) |             |              |             |           |             |             |             |            |
|-------------------|------------------------------------|-------------|--------------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                   | As                                 | Mn          | Zn           | Cu          | Cr        | Ni          | Pb          | Cd          | Co         |
| <b>Controlo</b>   | 259                                | 622         | 167          | 46,4        | <b>63</b> | <b>25,6</b> | 44,6        | 0,30        | 5,4        |
| <b>Lavaria</b>    | 7784                               | 1072        | <b>504,5</b> | <b>87,4</b> | 22        | 19,3        | <b>1977</b> | <b>12,0</b> | <b>6,4</b> |
| <b>Galeria</b>    | <b>&gt;10000</b>                   | <b>1133</b> | 280,4        | 42,5        | 14        | 4,60        | 216,5       | 9,32        | 1,5        |
| <b>R1</b>         | 1088                               | 811         | 193,8        | 2,60        | 3         | 3,30        | 13,05       | 3,05        | 0,3        |
| <b>Perto água</b> | 1601                               | 716         | 297,1        | 28,3        | 7         | 4,60        | 122,6       | 6,54        | 1,0        |
| <b>VR</b>         | 6,80                               | 488         | 70,0         | 38,9        | 60        | 29,0        | 27,0        | 0,41        | -          |

É possível verificar uma grande variabilidade nos valores obtidos na concentração de elementos potencialmente tóxicos nos locais amostrados, sendo que dos elementos analisados o As demonstrou ser o elemento mais dominante, seguido do Mn e do Zn. Cerca de 75% dos teores obtidos de EPT nas amostras de solo são superiores aos valores de referência mundial para os solos que constam na bibliografia indicada, o que reflete um elevado grau de contaminação na área de estudo.

A Lavaria correspondeu ao local com teor mais elevado de Zn, Cu, Pb, Cd e Co, enquanto a Galeria registou os valores mais elevados de As e Mn. No local Controlo observaram-se os valores mais altos de Cr e Ni e os mais baixos da maior parte dos restantes elementos. De entre os locais sob influência mineira (não inclui o Controlo), a zona de rejeitos mineiros (R1) foi que exibiu os valores mais baixos.

Apesar de naturalmente presentes no meio ambiente, os EPT em estudo apresentam claramente concentrações excessivas na área de estudo podendo contribuir para um elevado grau de risco ecológico.

## 5.2. Plantas

### 5.2.1. Composição química

A tabela 4 mostra as concentrações dos EPT em estudo obtidas, por ICP-MS e XRF respetivamente, para os órgãos florais de *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. , nos diferentes locais de amostragem.

Tabela 4 - Concentração de elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras de flores, folhas e caules das espécies *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. . Valores obtidos por ICP-MS.

| Local                   |        | Elementos analisados por ICP-MS (ppm = mg/kg) |      |      |      |      |      |      |        |       |
|-------------------------|--------|-----------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|--------|-------|
| <i>Erica arborea</i> L. |        | As                                            | Mn   | Zn   | Cu   | Cr   | Ni   | Pb   | Cd     | Co    |
| Controlo                | Folhas | 0,28                                          | 334  | 14,8 | 4,93 | 0,60 | 4,26 | 0,57 | <0,006 | 0,052 |
|                         | Caules | 0,35                                          | 549  | 19,9 | 9,00 | 0,90 | 2,66 | 1,54 | 0,016  | 0,125 |
| Lavaria                 | Folhas | 1,68                                          | 233  | 72,6 | 3,31 | 0,30 | 0,89 | 0,37 | <0,006 | 0,044 |
|                         | Caules | 1,39                                          | 286  | 74,2 | 6,72 | 0,70 | 0,95 | 1,63 | 0,030  | 0,133 |
| Galeria                 | Folhas | 2,00                                          | 112  | 50,6 | 4,19 | 0,40 | 0,65 | 0,22 | 0,010  | 0,023 |
|                         | Caules | 2,01                                          | 112  | 39,0 | 8,64 | 0,70 | 0,69 | 0,93 | 0,137  | 0,078 |
| R1                      | Folhas | 2,91                                          | 180  | 70,9 | 3,94 | 0,60 | 1,39 | 0,42 | <0,006 | 0,040 |
|                         | Caules | 1,45                                          | 234  | 32,6 | 7,37 | 0,60 | 1,33 | 1,34 | 0,016  | 0,107 |
| Perto água              | Folhas | 2,84                                          | 44,1 | 47,7 | 4,04 | 0,40 | 0,80 | 0,21 | <0,006 | 0,024 |
|                         | Caules | 1,66                                          | 79,0 | 38,7 | 6,76 | 0,60 | 0,63 | 0,91 | 0,017  | 0,081 |

| <i>Calluna vulgaris</i> L. |        | As   | Mn   | Zn   | Cu   | Cr   | Ni   | Pb   | Cd     | Co    |
|----------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|--------|-------|
| Controlo                   | Flores | 0,83 | 430  | 17,4 | 7,02 | 0,50 | 3,61 | 0,25 | <0,006 | 0,101 |
|                            | Folhas | 1,14 | 852  | 27,2 | 6,65 | 2,30 | 5,24 | 0,98 | 0,009  | 0,168 |
| Lavaria                    | Flores | 10,6 | 170  | 37,1 | 7,51 | 1,10 | 1,31 | 0,65 | 0,024  | 0,089 |
|                            | Folhas | 34,1 | 425  | 39,7 | 5,49 | 1,40 | 1,62 | 1,81 | 0,040  | 0,088 |
| Galeria                    | Flores | 3,14 | 140  | 47,3 | 10,1 | 0,60 | 1,69 | 0,40 | 0,026  | 0,055 |
|                            | Folhas | 16,6 | 311  | 74,7 | 6,67 | 1,10 | 1,34 | 0,68 | 0,064  | 0,093 |
| R1                         | Flores | 2,25 | 323  | 26,5 | 5,90 | 1,50 | 1,36 | 0,48 | 0,015  | 0,050 |
|                            | Folhas | 12,0 | 1110 | 51,2 | 2,67 | 1,00 | 0,89 | 0,59 | 0,014  | 0,075 |
| Perto água                 | Flores | 1,80 | 154  | 27,1 | 5,51 | 0,80 | 0,62 | 0,24 | <0,006 | 0,041 |
|                            | Folhas | 3,86 | 265  | 53,6 | 4,02 | 0,50 | 0,72 | 0,48 | 0,012  | 0,052 |

Verificou-se que, para o mesmo elemento, a concentração química das plantas variava consideravelmente entre as duas técnicas de análise, ICP-MS e XRF (em anexo), tendo para esta última não obtido valores muito coerentes. Isto pode dever-se a diversos fatores tais como: os parâmetros otimizados para o próprio equipamento (padrões de calibração para os diversos elementos, algoritmos de cálculo), processamento das amostras para medição ou quantidade de amostra necessária.

De acordo com os dados das concentrações de EPT nas plantas verifica-se que, na generalidade, os teores nos locais sob influência mineira são mais baixos em relação à amostra Controlo. No caso da espécie *Erica arborea* L. apenas o As e o Zn, e na *Calluna vulgaris* L., o As, o Zn e o Cd apresentam concentrações mais elevadas que o Controlo para todos os locais. Mais uma vez, regista-se um predomínio do As, Mn e Zn mostrando uma relação entre os EPT com teores mais altos nas plantas e no solo.

De entre os locais expostos a contaminação, a Lavaria e a Galeria foram os que registaram os maiores teores de EPT, sendo os mais baixos pertencentes ao local Perto de água.

Verificou-se também um teor global de elementos químicos mais alto na espécie *Calluna vulgaris* L. comparativamente à *Erica arborea* L., tendo esta registado apenas concentrações mais elevadas de Co para todos os locais, exceto para o Controlo.

De um modo geral, quer nas amostras de *Erica arborea* L., quer nas de *Calluna vulgaris* L., é possível observar uma tendência de hierarquização das concentrações dos elementos nos órgãos da planta, refletindo comportamentos de bioacumulação diferentes na própria planta. Como expectável, uma maior concentração foi observada nos caules, seguido das folhas e, por fim, nas flores. Nos poucos casos em que não se verificou esta tendência (*Erica arborea* L. – As, Zn, Ni; *Calluna vulgaris* L. – Cu, Ni) pode constatar-se que, à exceção do As, corresponde a elementos que são considerados nutrientes para as plantas, havendo uma bioacumulação mais elevada nas partes superiores das plantas.

## 5.3. Pólen

### 5.3.1. Fertilidade polínica

Relativamente à percentagem de germinação do pólen de *Erica arborea* L., foi possível observar variações significativas entre os diferentes locais de amostragem [figura 15].

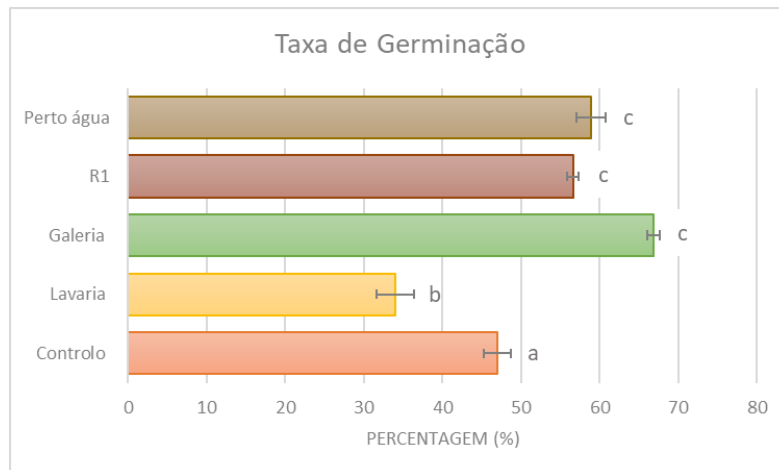


Figura 15 - Resultados da taxa de germinação das amostras de pólen após 24h de incubação (letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas  $p < 0,05$ ).

As taxas de germinação mais baixas (inferior a 50%) foram registadas nos locais de amostragem Controlo e Lavaría, sendo este último o que exibe um valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ), cerca de 34%. Contrariamente, os locais Galeria, R1 e Perto de água, apresentaram taxas de germinação significativamente superiores ( $> 55\%$ ), com uma taxa máxima de germinação, aproximadamente 67%, na Galeria.

### 5.3.2. Conteúdo proteico solúvel

O ensaio de quantificação do conteúdo proteico solúvel do pólen indicou que na maioria dos locais de amostragem sob a influência mineira observou-se um teor proteico inferior em comparação à amostra Controlo, sendo o menor valor registado no local R1 (3626  $\mu\text{g}$  de proteína/mL). Apenas a Galeria, com 4768  $\mu\text{g}$  de proteína/mL, obteve um teor proteico ligeiramente superior ao Controlo [figura 16].

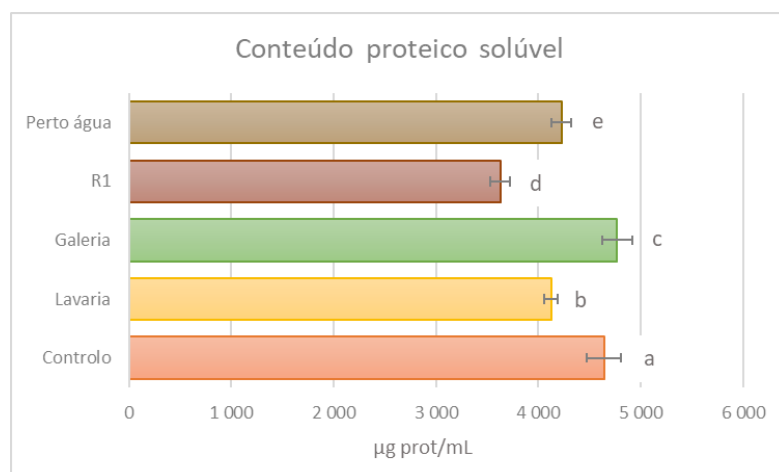


Figura 16 - Resultados do teor de proteínas solúveis do pólen nos diferentes locais amostrados (letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas  $p < 0,05$ ).

Após a ANOVA, observou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios do teor de conteúdo proteico solúvel no pólen de *Erica arborea* L. nos cinco locais de amostragem, não identificando qualquer semelhança estatística entre os mesmos.

Apesar destas diferenças, após eletroforese SDS – PAGE observaram-se diversas bandas características que apresentaram um perfil semelhante entre os locais amostrados [figura 17].

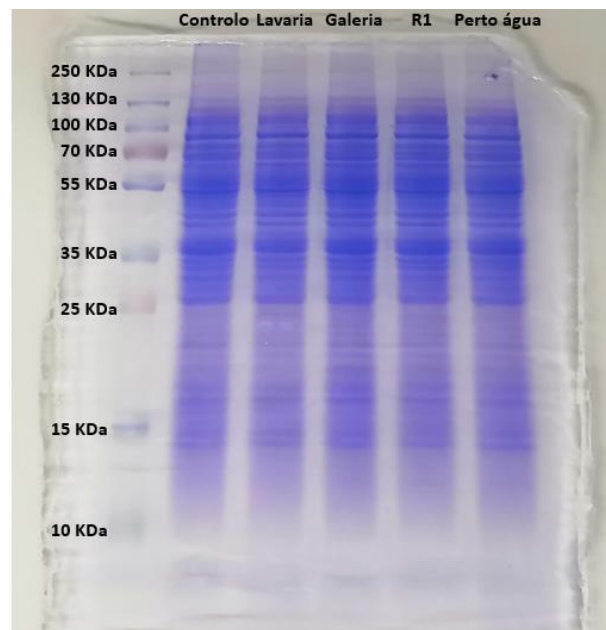


Figura 17 - Resultados do gel SDS-PAGE, corado com azul de Coomassie, de proteínas solúveis totais dos extratos de pólen de *Erica arborea* L. .Pesos moleculares das bandas expressos em KDa.

Após coloração com azul de Coomassie foi possível observar várias bandas que indicam a presença de proteínas específicas com pesos moleculares compreendidos entre os 10 e os 130 KDa, reconhecendo como as mais proeminentes as localizadas no intervalo 25 – 100 KDa.

Detetou-se, comparativamente aos restantes locais, uma maior intensidade de coloração das bandas no local de amostragem Controlo, o que vai de encontro ao valor superior de concentração média de proteína solúvel no pólen registado para este local. Por sua vez, a Lavaria que corresponde a um dos locais com menor teor de proteína no pólen, apresenta uma menor coloração nas bandas.

### 5.3.3. Microspectroscopia Raman

A análise da microspectroscopia Raman das amostras de pólen de *Erica arborea* L. permitiu a obtenção de 5 espectros médios correspondentes a cada local de amostragem [figura 18].

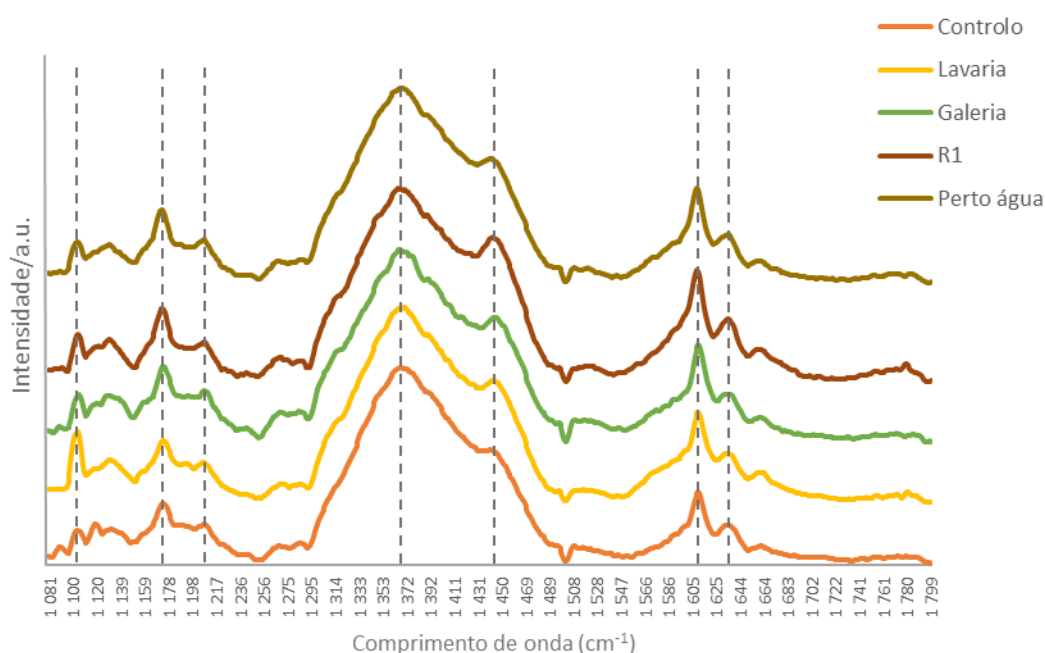


Figura 18 - Espectros médios Raman do pólen de *Erica arborea* L. dos 5 locais de amostragem analisados, com os 7 principais picos assinalados a tracejado.

Os resultados mostraram pequenas variações de posição nas bandas de comprimento de onda 1100 – 1139 cm⁻¹ do espectro Controlo, sem formação de nenhuma banda nova.

Foi realizada uma análise pormenorizada com alguns dos parâmetros Raman obtidos, nomeadamente, comprimento de onda do pico, largura a meia altura, intensidade e área total do mesmo, para cada um dos 26 picos consideradas no processo de deconvolução, com destaque para os 7 picos proeminentes (assinalados a tracejado na figura 18). Os resultados apresentaram a presença de pequenas alterações, a nível da largura a meia altura, intensidade e área, mas não suficientes para serem significativas ( $p < 0,05$ ). Isto pode indicar que qualquer diferença entre o pólen dos diferentes locais poderá não ser detetado na estrutura química da parede do respetivo pólen, uma vez que não se verificam diferenças significativas.

### 5.3.4. Composição química

Os dois métodos de análise, ICP-MS e XRF, para obtenção da composição química das amostras de pólen em estudo apresentaram resultados para uma variedade de elementos naturalmente presentes no pólen, contudo no nosso estudo apenas nos focamos nos EPT [tabela 5].

Tabela 5 - Concentração dos elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras do pólen da espécie *Erica arborea* L. Valores obtidos por ICP-MS (s.d. – sem dados; VL - valores limite para pólen de abelha (Campos et al., 2008)).

| Local             | Elementos analisados por ICP-MS (ppm = mg/kg) |      |      |      |      |      |      |       |      |
|-------------------|-----------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
|                   | As                                            | Mn   | Zn   | Cu   | Cr   | Ni   | Pb   | Cd    | Co   |
| <b>Controlo</b>   | 1,39                                          | s.d. | s.d. | 30,6 | 1,53 | 7,62 | 1,18 | 0,016 | s.d. |
| <b>Lavaria</b>    | 17,52                                         | s.d. | s.d. | 17,9 | 2,98 | 5,83 | 1,31 | 0,038 | s.d. |
| <b>Galeria</b>    | 3,26                                          | s.d. | s.d. | 17,6 | 7,04 | 4,78 | 0,65 | 0,015 | s.d. |
| <b>R1</b>         | 3,45                                          | s.d. | s.d. | 13,1 | 1,92 | 4,20 | 0,25 | 0,005 | s.d. |
| <b>Perto água</b> | 4,45                                          | s.d. | s.d. | 11,6 | 2,65 | 4,78 | 1,32 | 0,024 | s.d. |
| <b>VL</b>         | 0,5                                           | –    | –    | 2-16 | –    | –    | 0,5  | 0,1   | –    |

Tal como mencionado para as plantas, os dois métodos de análise demonstram variabilidade na composição química do pólen, tendo sido obtidos diferentes valores para o mesmo elemento. Verificou-se que o método XRF (em anexo) ainda necessita de otimização e estudo no tipo de material vegetal utilizado.

Contrariamente do que se observou para as plantas, que registavam teores inferiores aos do solo, o pólen apresenta valores superiores aos obtidos para as partes florais de *Erica arborea* L. .

Pela análise dos resultados, observa-se ainda que, dos EPT em estudo, apenas o Cd apresentou valores inferiores ao limite aceite pela bibliografia indicada, contrariamente aos restantes elementos, tendo-se registado uma maior abundância do As, Cu e Ni nos grãos de pólen. Verifica-se também que, de um modo geral, os teores de EPT no pólen são baixos (em relação à amostra Controlo), à exceção do As e do Cr, e, no caso da Lavaria e Perto de água, também o Pb e o Cd.

Como se tem denotado pelas amostras do solo e das plantas, também no pólen o As apresenta concentrações mais elevadas, quer seja em comparação aos restantes elementos em estudo, quer seja em relação à amostra Controlo. Observa-se ainda que,

mais uma vez, de entre os locais contaminados, na Lavaria obtiveram-se os maiores teores de EPT, sendo o R1 o local responsável pelos menores.

## 5.4. Análise estatística

A correlação de Spearman foi realizada a fim de avaliar a existência de associações estatisticamente significativas entre as distintas variáveis analisadas. Os resultados obtidos mostraram a inexistência de correlação entre os resultados polínicos (fertilidade, conteúdo proteico solúvel e composição química), os parâmetros do solo (pH, condutividade elétrica, matéria orgânica e teores de EPT) e os teores de EPT nas folhas e caules da espécie *Erica arborea* L. .

Já a análise de Cluster, que permite classificar um conjunto de categorias em grupos homogêneos, foi realizada tendo em conta apenas as análises do pólen [figura 19a], a composição química do pólen e da vegetação de *Erica arborea* L. [figura 19b] e, por fim, todas as variáveis [figura 19c].

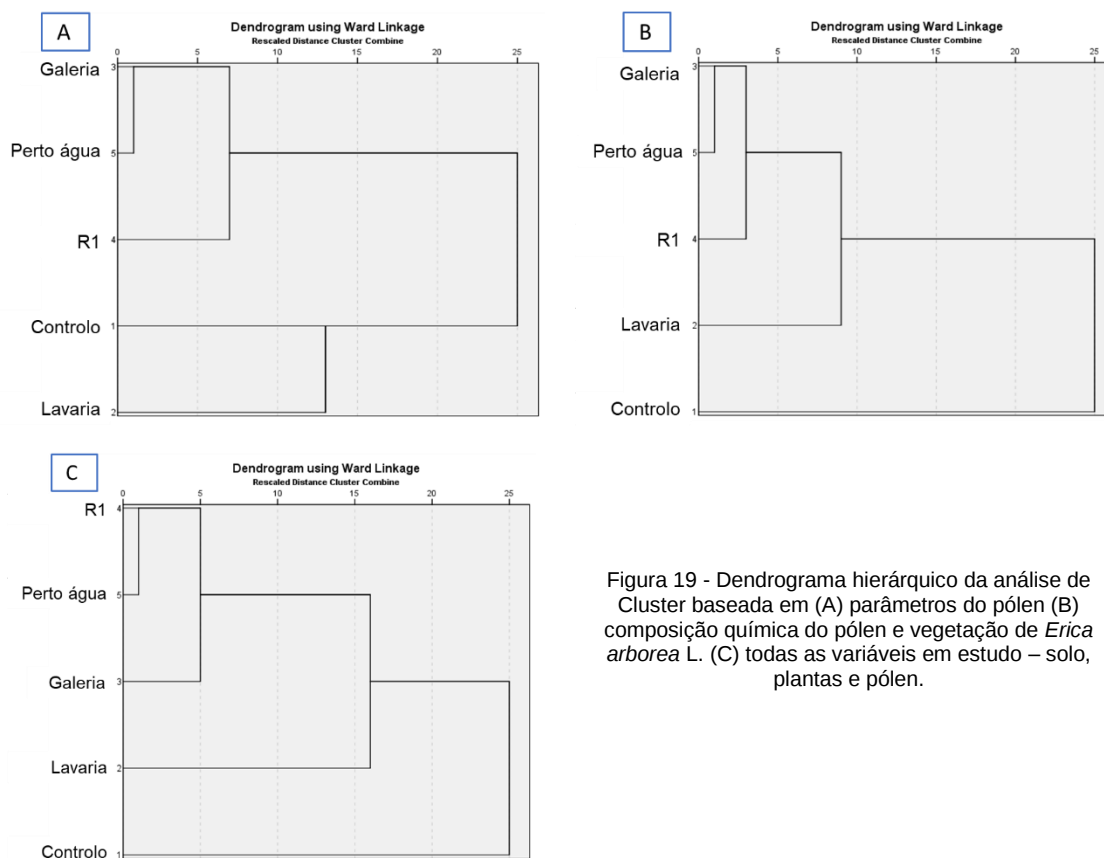


Figura 19 - Dendrograma hierárquico da análise de Cluster baseada em (A) parâmetros do pólen (B) composição química do pólen e vegetação de *Erica arborea* L. (C) todas as variáveis em estudo – solo, plantas e pólen.

Observou-se a existência de 3 grupos distintos: o primeiro constituído pela maioria dos locais sob influência mineira (Galeria, R1 e Perto de água), o segundo constituído pela Lavaria (local mais contaminado) e um outro composto apenas pelo Controlo, indicando a presença de características diferentes entre os locais na zona mineira e o Controlo.

## Capítulo 6

---

### Discussão dos resultados

## 6. Discussão

Mesmo depois de muitos anos de encerramento, a área de influência das minas de Regoufe ainda apresenta bastantes vestígios da época de exploração, podendo ainda apresentar alguns de impactos no ambiente.

Vários trabalhos que reportam dados de áreas mineiras de diversas partes do mundo, demonstram que os solos das mesmas estão seriamente contaminados com metais pesados (Dudka et al., 1995; Ullrich et al., 1999; Bhuiyan et al., 2010; Lavazzo et al., 2012; Roca, et al., 2012; Bech et al., 2012; Boussen et al., 2013; Kostarelos et al., 2015; Tóth et al., 2016; Álvarez-Ayuso & Abad-Valle, 2017; Antoniadis et al., 2017; Ding et al., 2017; Fodoué et al., 2022) excedendo os valores de concentração de base dos solos naturais circundantes e, muitas vezes, os limites regulamentares para alguns poluentes inorgânicos, podendo constituir uma preocupação para o meio ambiente e saúde humana.

Nos solos de Regoufe foram encontradas concentrações de EPT mais baixas às registadas na literatura em outros locais de Portugal sob influência mineira (Silva et al., 2005; Candeias et al., 2011; Alvarenga et al., 2013; Antunes et al., 2018; Fonseca, 2019).

No que concerne ao local de amostragem Controlo, por ser um local sem influência mineira, seria de esperar que este apresentasse os valores mais baixos para todos os elementos, assim como valores mais próximos dos de referência. O mesmo não se observa neste estudo, pelo que o enriquecimento de EPT neste solo poderá ser consequência de enriquecimento metalogénico natural.

De entre os EPT presentes nas amostras de solo destaca-se o As pelas suas elevadas quantidades, o que vai de encontro a estudos realizados na mesma área mineira. Durães et al. (2021) verificaram que as concentrações mais elevadas de EPT foram observados para As, comparativamente aos restantes elementos. Também Sousa (2016) obteve resultados de solos altamente enriquecidos em As, Cd, Pb, W e Zn, com destaque para o As, Cd e W.

O enriquecimento anormal de arsénio na área mineira de Regoufe pode resultar dos efeitos provocados pela exploração mineira, mas também da própria paragénesese do local em estudo – arsenopirite (Favas, 2008), que contribuiu para o enriquecimento dos próprios solos.

A presença e a concentração de EPT no solo não definem por si só que o meio envolvente seja prejudicado. Existe um conjunto de condições específicas que determinam a possibilidade de existirem benefícios ou prejuízos. Uma dessas condições é a mobilidade dos elementos, que vai refletir o seu transporte e biodisponibilidade, por sua vez, relacionada com características do solo (pH, teor de matéria orgânica, condutividade elétrica, potencial redox entre outros) (Ross, 1994).

O pH é um fator que dá indicação sobre a acidez ou alcalinidade e que, por sua vez, influencia a mobilidade dos metais pesados no solo (Ullrich et al., 1999; Huang et al., 2013) e, conseqüentemente, a disponibilidade dos mesmos para as plantas. Por norma, quanto mais baixo for o pH do solo, maior será a mobilidade dos metais, podendo levar à toxicidade (Dudka et al., 1995). Assim, no caso do nosso estudo, o facto de serem solos com um pH na ordem dos 5 pode potenciar a biodisponibilidade dos EPT para as plantas, o que pode explicar as concentrações de elementos também registadas nas amostras das plantas em estudo.

Além disso a acidez das amostras aponta tanto para a presença de circunstâncias que favorecem a mobilização dos EPT, como para o contributo da alteração dos sulfuretos provenientes das escombreyras, que baixam o pH dos solos através da sua oxidação (Fonseca, 2019).

Apesar do pH do solo ser ácido, os valores de condutividade elétrica são baixos.

A condutividade elétrica transmite a capacidade de um material em conduzir corrente elétrica, indicando a quantidade relativa de iões que são mobilizados a partir das frações de troca e das fases facilmente solubilizáveis (Fonseca, 2019). Esta depende de condições estáticas e dinâmicas do solo, tais como, salinidade, mineralogia, teor em argila, densidade, teor em água e temperatura do solo (Johnson et al., 2005).

Baixos valores de pH tendem a promover o aumento de iões em solução, pelo que estão associados a elevados valores de condutividade elétrica, no entanto isto acontece quando as características físicas do solo são propícias à existência de complexos de adsorção (mineral mais orgânico). Relativamente à componente mineral, Sousa (2016) e Durães et al. (2021) também observaram, para o mesmo local de estudo, valores muito baixos de condutividade elétrica no solo (no intervalo 7,8 – 158  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) que justificaram pela elevada quantidade de quartzo presente nas amostras e cuja meteorização em frações granulométricas mais finas é menor, caracterizando-se por ser pouco reativo e apresentar baixa capacidade de adsorção. Quanto à componente orgânica, ela também desempenha um papel fundamental nos processos de absorção dos metais/metaloídes

nos solos (Lee et al., 1998; Agbenin & Olojo, 2004; Hiradate & Uchida, 2004; Yang et al., 2019). No nosso estudo, verificamos que a percentagem de matéria orgânica no solo não era elevada, tal como Sousa (2016) registou para o mesmo local sobretudo nos locais associados a contaminação das escombadeiras, devido à granulometria bastante grosseira do material. Por sua vez, os valores mais altos ocorreram em solos naturais com forte cobertura vegetal, à semelhança do que acontece no nosso estudo no local de amostragem referente ao Controlo.

No solo as concentrações de elementos podem encontrar-se sob a forma menos disponível, a qual inclui por exemplo iões ligados à estrutura cristalina dos minerais primários e secundários; iões adsorvidos nas superfícies dos minerais secundários; iões ligados à matéria orgânica no estado sólido; complexos orgânicos e inorgânicos solúveis na solução do solo ou potencialmente disponível para as plantas sob a forma de iões livres ou complexos solúveis (Alloway, 2012). No caso dos solos de áreas mineira, à semelhança de Regoufe, a elevada concentração e biodisponibilidade de metais pesados como o Pb e o As, em conjunto com condições de baixos valores de pH e baixo teor de matéria orgânica, potencia, por norma, um coberto vegetal naturalmente escasso e com dominância de plantas tolerantes (Monterroso et al., 2014). De facto, existem plantas que, devido a condições adversas, se adaptaram a solos menos favoráveis como o caso das metalófitas – espécie de plantas que só se encontram em solos com concentrações elevadas de metais, ou pseudo-metalófitas – espécie de plantas que se encontram quer em solos com elevada ou com concentrações normais (Baker, 1987). Neste tipo de locais contaminados as plantas desenvolveram mecanismos biológicos para resistir, tolerar ou prosperar nos solos tóxicos (Whiting et al., 2004). Por norma observam-se por norma duas estratégias básicas (Baker, 1981): i) “excluir” – na qual as plantas são capazes de tolerar metais específicos no substrato, restringindo fisiologicamente a entrada dos metais na raiz e/ou o seu transporte para partes aéreas da planta; ii) “(hiper)acumular” – na qual, tal como o nome indica, as plantas são capazes de acumular concentrações anormalmente elevadas de metais nas suas partes aéreas, sobretudo folhas e caules, sem sintomas visíveis de toxicidade (Verbruggen et al., 2009). No caso do nosso estudo verificou-se que a *Caluna vulgaris* L. é mais hiperacumuladora que a *Erica arborea* L., no entanto esta última espécie também apresentou na sua composição química As e Pb.

Mais de 450 espécies de plantas demonstraram ser hiperacumuladoras de metais vestigiais (Zn, Ni, Mn, Cu, Co e Cd), metalóides (As) e não-metais (Se), sendo uma grande parte hiperacumuladora de Ni (75%) (Verbruggen et al., 2009). Apesar do

número exato de plantas resistentes a metais ser desconhecido, acredita-se que centenas de milhares possam existir (Whiting et al., 2004).

As plantas requerem nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, inclusive alguns nutrientes inorgânicos como é o caso do  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  (Sharma, 2006). A interação destes nutrientes nas plantas é altamente dependente das suas concentrações relativas e das características específicas de cada espécie vegetal, pelo que, quando presentes em concentrações baixas não representam danos nem toxicidades; já quando acumulados em níveis mais elevados passam a considerar-se EPT - potencialmente perigosos.

Deste modo, dadas as condições específicas de toxicidade nos ecossistemas alterados dos solos de áreas mineiras, o uso de cobertura vegetal é uma opção eficaz e viável para evitar, não só a dispersão dos EPT pelo vento e erosão hídrica, assim como imobilizar ou mobilizar os poluentes pelas plantas (Matanzas et al., 2021). A fitorremediação desses mesmos solos requer assim a adoção de plantas tolerantes aos EPT presentes nesses solos.

Muitos investigadores exploraram o processo de fitorremediação e a sua eficácia em minas abandonadas situadas por todo o mundo. Por exemplo, Bech et al. (2002) apresentaram os resultados provenientes de espécies vegetais de três diferentes zonas mineiras na América do Sul (Mina Turmalina no Peru, Mina San Bartolomé no Equador e Mina El Teniente no Chile). As diferentes espécies de plantas recolhidas nos solos altamente contaminados apresentaram diferenças na acumulação de metais pesados. Entre as espécies de gramíneas (Poaceae), a maior concentração de As foi observada na espécie *Paspalum* ( $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e *Eriochloa ramosa* ( $460 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na mina do Peru, e em *Holcus lanatus* e *Pennisetum clandestinum* ( $> 200 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na mina do Equador. A concentração mais elevada de Cu foi encontrada nos rebentos de *Mullinum spinosum* ( $870 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e em *B. cynapiifolia* ( $620 \text{ mg kg}^{-1}$ ). A acumulação de Zn foi mais elevada nos rebentos de *Baccharis amdatensis* ( $> 1900 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e em *Rumex crispus* ( $1300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na mina do Equador. Pratas et al. (2005) avaliaram o potencial biogeoquímico de diferentes espécies de plantas, que crescem em minas portuguesas abandonadas contaminadas com As, Sb e W, para recuperação dos solos contaminados. No que concerne a acumulação de arsénio, verificaram que espécies como *Pinus pinaster*, *Calluna vulgaris* L., *C. tridentatum*, *C. ladanifer*, *Erica umbellata* e *Quercus ilex subsp. ballota* mostravam bastante eficácia. Na mina de cobre de São Domingos (Portugal), Abreu et al. (2008) identificaram a presença de duas espécies, *Erica andevalensis* e *Erica australis*, que cresciam espontaneamente em solos portugueses

altamente contaminados com Pb, As e Sb. Verificaram que ambas as espécies, mesmo para solos não contaminados, são tolerantes ao Al e acumuladoras de Mn e em solos contaminados, são também tolerantes ao As. Das & Maiti (2007) avaliaram a acumulação de metais na vegetação naturalmente colonizadora de uma zona de rejeitos de uma mina de cobre abandonada (mina de Rakha, Jharkhand, Índia). Verificaram que nas amostras de *Ammania baccifera* os níveis de acumulação de Cu nas partes das raízes foram superiores a 1000 mg kg<sup>-1</sup>, concluindo que os metais acumulados estavam maioritariamente distribuídos nos tecidos das raízes, o que sugere a existência de uma estratégia de exclusão para a tolerância aos metais. Lottermoser et al. (2011) determinaram a absorção de elementos pelas espécies *Ulex europaeus* e *Calluna vulgaris* L. , que crescem em zonas de rejeitos abandonados em Carnon Valley, Cornwall, Reino Unido. As análises biogeoquímicas demonstram que ambas as espécies são metalófitas oportunistas e pioneiras, com a capacidade de excluir metais e As da sua biomassa acima do solo. Fernández et al. (2017) analisaram as interações solo-planta com o objetivo de identificar espécies vegetais com o potencial de fitorremediação em zonas de antigos rejeitos mineiros extremamente contaminados por metais pesados no Principado das Astúrias (Espanha). Os resultados identificaram a *Coincya monensis* como uma hiperacumuladora de Zn e com um elevado fator de transferência de Cd do solo para a planta. Entre as gramíneas, a *Agrostis durieui* tolerou altas concentrações de Pb, e entre as espécies de leguminosas, *Cytisus striatus*, *Cytisus scoparius*, *Genista legionensis* e *Lotus corniculatus* mostraram-se como eficientes na exclusão de metais, identificando o elevado potencial destas espécies vegetais para fitoestabilização ou fitoextração de solos contaminados por Hg, As, Zn e/ou Pb. Matanzas et al. (2021) ao analisarem o solo e vegetação numa antiga zona de mineração de mercúrio também nas Astúrias (Espanha), verificaram a existência de uma flora diversificada tolerante aos principais EPT na região, nomeadamente As, Hg e Pb, tendo a *Calluna vulgaris* registado as concentrações nas partes aéreas de 571 mg/kg e nas raízes de 1270 mg/kg. Além disso, esta espécie destacou-se pela capacidade de translocação de Pb nas folhas, apontando para o seu potencial como bioindicadora ou para fitoextração.

Posto isto, verifica-se que várias são as espécies com capacidade de fitorremediação em solos altamente contaminados de minas abandonas, de entre as quais os género Erica e Calluna fazem parte, indicando assim possibilidade do uso de *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. para a fitorremediação dos solos contaminados de Regoufe, dado que apresentam elevados teores de EPT presentes nestes mesmos solos.

A *Calluna vulgaris* L., espécie comum na Europa que cresce tipicamente em solos ácidos e com déficit em nutrientes (Gimingham, 1960), apresenta grande sensibilidade à tolerância de metais (Cucu et al., 2022), o que pode justificar a acumulação das concentrações mais elevadas dos EPT em estudo nas partes vegetais desta espécie, em comparação à *Erica arborea* L. . Devido a esta sensibilidade a *Calluna vulgaris* L. tem sido amplamente utilizada como bioindicador para a detecção de diferentes metais pesados presentes no solo (Cucu et al., 2022).

Para além da acumulação geral de EPT nas amostras das plantas em estudo, verificou-se, ainda, uma diferença na acumulação de metais pesados nos diferentes órgãos das espécies *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. . Similarmente, aos nossos resultados, também Marks & Bannister (1978) registaram a distribuição da concentração de Pb nos tecidos de *Calluna vulgaris* L. numa zona de escombreira de uma mina de chumbo. Verificaram que as concentrações mais elevadas se encontravam nas raízes (1316 mg kg<sup>-1</sup>), os caules e rebentos apresentavam valores intermédios (467,5 e 464,5 mg kg<sup>-1</sup>, respetivamente), sendo os valores mais baixos registados nas flores (102,5 mg kg<sup>-1</sup>). Nouri et al. (2009) determinaram a concentração de metais (Cb, Zn, Fe e Mg) acumulados por 12 espécies de plantas nativas situadas na área mineira de ferro e cobre Hame Kasi (Hamadan, Irão). Os resultados mostraram que as espécies vegetais diferem muito na capacidade de acumular metais, porém, de um modo geral, verificou-se que os tecidos radiculares das 12 espécies acumularam concentrações mais elevadas (Zn: 300 mg kg<sup>-1</sup> - 1200 mg kg<sup>-1</sup>, Cu: 85 mg kg<sup>-1</sup> - 182 mg kg<sup>-1</sup>, Mn: 100 mg kg<sup>-1</sup> - >1200 mg kg<sup>-1</sup>) comparativamente aos rebentos, que mantiveram níveis mais baixos (Zn: 50 mg kg<sup>-1</sup> - 360 mg kg<sup>-1</sup>, Cu: 63 mg kg<sup>-1</sup> - 150 mg kg<sup>-1</sup>, Mn: < 100 mg kg<sup>-1</sup> - 190 mg kg<sup>-1</sup>). Isto indica, para além de uma mobilidade interior limitada nas plantas, a capacidade de uma absorção e translocação bastante equilibrada de metais em condições de forte contaminação.

Apesar destas concentrações nas plantas indicadas na literatura corresponderem a valores mais elevadas do que as obtidas no nosso estudo, mostram uma tendência de diluição dos EPT desde o caule até às flores, que se observa também no nosso trabalho.

No nosso estudo foi ainda testado o uso de um equipamento portátil para medição da composição química por XRF, dado ser uma metodologia acessível e não destrutível. Porém verificamos alguns problemas na determinação da concentração de determinados elementos assim como discrepância em comparação com os valores medidos pela técnica de ICP-MS. A utilidade desta metodologia portátil nas nossas amostras requer ainda alguma otimização dado os espectros complexos obtidos,

particularmente de plantas e pólen, assim como alguma incerteza na densidade e espessura das amostras em estudo. Também, sendo um método não destrutivo, existem alguns constrangimentos relacionados com a não homogeneidade da amostra (que no nosso caso de estudo é bastante heterogénea), pelo que o feixe incidente pode estar a passar num determinado ponto que não corresponde ao ponto mais concentrado dessa amostra, ou a medir o que é fácil de alcançar, podendo não estar a representar todos os elementos existentes. No ICP-MS a amostra é destruída, sendo que a totalidade dos elementos fica disponível para análise, facilitando a deteção dos elementos presentes.

A toxicidade dos metais pesados é um dos principais stresses abióticos que conduz a efeitos negativos nas plantas (Muradoglu et al., 2017). Como se verificou, a absorção dos elementos no solo pode ser realizada pelas raízes das plantas, podendo mover-se, em seguida, pelos diferentes órgãos. Embora no nosso caso de estudo se verifique uma diluição da concentração de EPT das raízes para os órgãos emergentes, estes elementos podem ainda alcançar as partes reprodutivas da planta que inclui as anteras e os grãos de pólen, podendo comprometer o seu desenvolvimento (Yousefi et al., 2011). De facto, no nosso estudo, foram encontrados elementos como o As, Cr, Ni e Pb mostrando, assim, que os grãos de pólen podem conter traços desses elementos potencialmente tóxicos. Posto isto, especial importância deve ser dada ao pólen, até porque são considerados mais sensíveis aos poluentes do que as partes vegetais das plantas (Muradoglu et al., 2017).

A fertilidade polínica, que é um bom indicador da qualidade do pólen, pode ser influenciada por diversos fatores, sejam eles genéticos, ambientais e agronómicos (Pereira et al., 2018). Ela pode ser avaliada nomeadamente pela viabilidade do pólen maduro e capacidade de germinação, através da formação e desenvolvimento dos tubos polínicos em condições in vitro (Stanley & Linskens, 2012). No nosso estudo, os fatores ambientais podem ser excluídos, pois os 5 locais amostrados encontram-se perante as mesmas condições climáticas e a influência da genética está atenuada pois a mesma espécie é analisada. Assim, as diferenças observadas na percentagem de germinação do pólen nos diferentes locais de amostragem serão certamente muito influenciadas pela condição do solo.

O pólen requer recursos da planta mãe para se desenvolver, amadurecer e germinar (Delph et al., 1997).

Em estudos realizados (Rapoport et al., 2012; Oteros et al., 2013; González-Parrado et al., 2015) foi possível verificar que, para além da temperatura que no nosso estudo não varia entre os locais de amostragem, também a disponibilidade da água é importante para o desenrolar das diferentes fenofases de uma espécie, podendo a sua limitação afetar o desenvolvimento das mesmas. Relativamente a este recurso na área em estudo, é possível observar a existência de algumas linhas de água nos locais de amostragem Galeria, R1 e Perto de água, que frequentemente estão secas na época estival, estando ausente zona da Lavaria e no Controlo. De facto, nos locais onde existe a presença de água, a percentagem de germinação do pólen é mais elevada o que pode indicar que os locais que apresentam menor disponibilidade de água durante a formação e desenvolvimento do pólen (Lavaria e Controlo) podem ver a sua fertilidade diminuída face aos outros locais. Esta correspondência pode indicar a não influência na fertilidade polínica da concentração de metais no pólen, uma vez que não existe correlação significativa entre a concentração de EPT e a percentagem de germinação. No entanto, deve-se ressaltar que, na zona da Lavaria a diminuta percentagem de germinação comparativamente aos outros locais em estudo poderá, também em alguma medida, ser influência da elevada concentração de EPT. De facto, as características do solo em que as plantas se desenvolvem são também um dos fatores relevantes (Delph et al., 1997; González-Parrado et al., 2015), dado que pode afetar a produção de pólen nas plantas, alterando o número de flores e/ou a produção de pólen por flor (Lau et al., 1995; Delph et al., 1997).

Ao trabalhar com *Cucurbita pepo*, Lau et al. (1995) investigaram os efeitos da fertilidade do solo e, pela primeira vez, da infeção micorriza na produção de pólen e no tamanho do grão de pólen. Os resultados mostraram que a fertilidade do solo assim como a infeção micorriza influenciaram significativamente características que afetam a função masculina das plantas, ou seja, a produção de flores estaminadas, produção de pólen por flor e tamanho do grão de pólen. Também Yousefi et al. (2011) estudaram os efeitos do stress de metais pesados na formação, desenvolvimento e estrutura da antera e do pólen da espécie *Chenopodium botrys* na área circundante da mina de ferro e cobre de Hame-Kasi (Hamedan, Irão). Estudos preliminares mostraram que esta espécie pode crescer em alguns solos contaminados com metais pesados, sendo uma espécie de planta altamente acumuladora de Cu e moderadamente acumuladora de Fe, Mn e Zn. Os resultados mostraram que o desenvolvimento das anteras foi seriamente afetado por metais pesados, tendo algumas amostras não conseguido completar o seu crescimento. Além disso, o número de grãos de pólen diminui significativamente nas plantas

recolhidas nas áreas poluídas, indicando, assim, que a presença de metais pesados em concentrações elevadas no solo pode induzir uma variedade de anomalias no desenvolvimento das anteras e do pólen. Ao observar os dados obtidos por ICP-MS para a composição química dos solos de Regoufe verifica-se que, de entre os 5 locais amostrados, na Lavaria são encontrados os teores mais altos de EPT, o que pode contribuir em parte para a taxa de germinação reduzida neste pólen.

Sawidis e Reiss (1995) verificaram a influência de diferentes concentrações de metais pesados na germinação do pólen e crescimento dos tubos polínicos de *Lilium longiflorum*. Neste estudo pode observar-se que o comprimento do tubo polínico dependia, não só da concentração de metais pesados, bem como do seu tempo de aplicação. Metais como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e o  $\text{Hg}^{2+}$  mostraram-se como os mais tóxicos reduzindo drasticamente o comprimento médio dos tubos polínicos. Similarmente aos resultados deste estudo, muitos outros investigadores relataram um semelhante efeito tóxico dos metais pesados, nomeadamente; Cd em *Lilium longiflorum* e *Nicotiana tabacum* (Sawidis, 2008); Cd e Cu em *Pisum sativum* L. (Sabrine et al., 2010); Cd em *Picea wilsonii* (Wang et al., 2014); Cu e Hg em cultivares de maçã (Muradoglu et al., 2017), os quais afetavam as taxas de germinação do pólen e o comprimento dos tubos polínicos.

O tubo polínico apresenta características únicas que podem ser comprometidas quando expostos a concentrações mais elevadas de metais pesados, que por conseguinte, poderão afetar o processo reprodutivo da planta (Sawidis & Reiss, 1995). Ao considerar as interações intracelulares dos metais pesados é importante distinguir entre metais tóxicos e metais essenciais. Ou seja, enquanto metais como por exemplo o cádmio, o alumínio, o cobalto e o mercúrio são considerados tóxicos nas células (McKinney & Chairman, 1993), o cobre, o ferro, o manganês e o zinco encontram-se naturalmente em concentrações vestigiais nos tubos polínicos em crescimento (Reiss et al., 1983).

De acordo com os dados das concentrações dos diferentes elementos no pólen, obtidos neste estudo por ICP-MS, e tendo em conta que um tétrada de pólen era considerado germinado quando o tubo polínico apresentava comprimento superior ao diâmetro do respetivo grão de pólen, observa-se que as maiores concentrações de Cu e Cd no pólen (metais com efeito mais tóxico) se encontram sobretudo na Lavaria e Controlo que, por sua vez, correspondem aos locais com menor taxa de germinação.

No que concerne o conteúdo proteico solúvel do pólen, dados publicados sugerem que os poluentes podem influenciar a expressão de proteínas do pólen, assim como

desempenhar um papel na presença ou ausência de bandas de proteínas em extratos comparativos (Sénéchal et al., 2015).

Vários são os estudos que descrevem o efeito de poluentes do ar na diminuição do teor de proteínas solúveis totais do pólen (Parui et al., 1998; Rezanejad et al., 2003; Majd et al., 2004; Bist et al., 2004; Guedes et al., 2009; Sousa et al., 2012; Ribeiro et al., 2013) demonstrando a sensibilidade do pólen na presença de poluentes atmosféricos, só que, neste caso em particular, a contaminação existente na área mineira de Regoufe não se deve a poluentes do ar, mas sobretudo a contaminação no solo ou nas plantas, existindo poucos estudos que abordem este tema.

Aina et al. (2010) avaliaram pela primeira vez efeitos da exposição das plantas a um solo contaminado com Cd na alergenicidade do pólen de *Poa annua*. Os resultados mostraram que o pólen das plantas expostas a solos contaminados com Cd libertou uma maior quantidade de proteínas alergénicas comparativamente às plantas de controlo (privadas de contaminação com Cd). Posto isto, pode deduzir-se que o registo de uma maior alergenicidade no pólen de plantas em solos contaminados com cádmio pode estar relacionado a um pólen com maior teor de proteína, neste caso de alergénios. A composição química dos solos de Regoufe, obtida por ICP-MS, demonstra que um dos locais com maior concentração de cádmio (9,32 ppm) pertence à Galeria que, por sua vez, corresponde ao local com maior teor proteico, verificando o mesmo para o local Perto de água que também apresenta elevadas concentrações de cádmio no solo. Observa-se ainda que R1 é dos locais com menor concentração de cádmio no solo e com menor conteúdo de proteína do pólen. Será interessante como trabalho futuro avaliar o potencial alergénico do pólen nos diferentes locais de amostragem.

Semelhantemente ao conteúdo de proteína no pólen, também a relação contaminação-perfil proteico do mesmo é maioritariamente estudada na presença de poluentes atmosféricos. Resultados diferentes foram relatados na literatura relativamente à comparação do perfil proteico entre pólen exposto e não exposto a poluentes. Alguns estudos não registaram alterações no perfil proteico entre os extratos de pólen em zonas poluídas e não poluídas (controlo) (Helander et al., 1997; Rezanejad, 2009; Sousa et al., 2012), contudo, outros observaram efetivamente uma redução na intensidade da coloração e, por vezes, desaparecimento de bandas proteicas do pólen exposto a poluição em comparação a pólen não exposto (controlo) (Parui et al., 1998; Rezanejad et al., 2003; Majd et al., 2004). Os nossos resultados são similares a estes últimos estudos, no qual se verifica uma maior intensidade de coloração nas bandas pertencentes ao local Controlo.

O pólen apresenta na sua composição uma diversidade de componentes (proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos e ácidos gordos, compostos fenólicos, enzimas, vitaminas, bioelementos), entre os quais fazem parte o Cl, P, Mg, Na, K, Fe, Cu, Zn, Mn, Si e Se (Campos et al., 2008; Komosinska-Vassev et al., 2015). Estes últimos elementos, intervêm em diversas funções realizadas no pólen, mas quando presentes em concentrações mais elevadas do que as necessárias, podem causar alterações nas funções do mesmo (Sawidis & Reiss, 1995).

No que concerne a áreas industrializadas, Popescu et al. (2010) determinaram o teor em Fe, Mn e Zn de amostras de pólen uniformemente distribuídas por diferentes zonas na região de Dambovită, com o objetivo de avaliar a utilização do pólen como bioindicador de poluição ambiental. Os resultados evidenciaram um teor mais elevado de metais pesados no pólen recolhido em zonas urbanas e industriais e um teor mais baixos em amostras de pólen recolhidas em zonas rurais ou não industriais, indicando a eficácia do pólen como um material biológico para biomonitorização dos níveis de metais pesados em estudos ambientais. Também Erdoğan et al. (2023) determinaram a composição de elementos minerais e os respetivos níveis de EPT de amostras de pólen recolhidas por abelhas em várias cidades da região oriental do Mar Negro da Turquia. Os resultados mostraram concentrações por  $\text{mg kg}^{-1}$  de pólen seco mais elevadas de Cd e Ni e mais baixas de Cr, Cu, Pb e As comparativamente às obtidas para o pólen de Regoufe. Inferiram também que a quantidade dos EPT no pólen de abelha é diretamente afetada pela composição do solo, condições climáticas, composição genética das plantas, processos agrícolas e apícolas. Um estudo realizado numa área pós-mineira de Montevecchio-Ingurtosu (sudoeste da Sardenha, Itália), determinou quantitativamente os teores de Pb, Cd e Cr em amostras de pólen de abelha (Satta et al., 2012). Os resultados indicaram que as concentrações médias de Cd e Pb foram significativamente mais elevadas nos locais de influência mineira relativamente à zona de controlo. Por sua vez, o teor médio de Cr foi significativamente mais elevado no local de controlo. Os resultados mostraram teores mais elevados de Cd e Pb e teores mais baixos de Cr nas amostras de pólen de Ingurtosu e Montevecchio, comparativamente aos teores obtidos nas amostras de pólen dos locais contaminados de Regoufe. O comportamento oposto foi observado para as amostras Controlo de ambos os locais. Álvarez-Ayuso & Abad-Valle (2017) avaliaram o estado ambiental de uma área afetada por atividades mineiras romanas, a fim de estabelecer os riscos atuais provenientes dessas antigas instalações. Os teores dos metais nas amostras de pólen

recolhidas foram analisados por ICP-MS, tendo-se verificado valores de As inferiores e valores de Cd superiores em relação aos obtidos para as amostras de Regoufe.

No nosso estudo, foram encontrados teores de EPT ligeiramente abaixo, dentro e acima dos valores relatados na literatura dependendo do estudo que se compara, indicando assim o grande potencial do pólen como bioindicador quando os níveis de contaminação são moderados a elevados.

Na área de Regoufe, destaca-se sobretudo a concentração de As no pólen, em particular no local Lavaría comparativamente aos restantes locais, o que pode estar relacionado com a biodisponibilidade deste elemento. Dados ainda não publicados no âmbito do projeto de investigação *SHS: Soil Health Surrounding former mining areas: characterization, risk analysis, and intervention* da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, mostram que o As está mais biodisponível no local Lavaría, quando comparado aos restantes locais. Apesar da Galeria apresentar a maior concentração deste elemento no solo ( $>10000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), o mesmo não se encontra tão disponível para as plantas. Contrariamente, na Lavaría ( $7784 \text{ mg As kg}^{-1}$  no solo) a sua biodisponibilidade mais elevada no solo, permite que uma maior concentração deste elemento chegue até ao pólen. Isto justifica o valor de As no pólen da Lavaría ( $17,52 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em relação aos valores obtidos nos restantes locais ( $1,39 - 4,45 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Neste trabalho, verifica-se também, de um modo geral, uma diluição das concentrações dos elementos nos diferentes órgãos das plantas de *Erica arborea* (teor nos caules > folhas), que não se verifica no pólen. Sendo o pólen um alimento bastante nutritivo, aquando da sua formação e maturação observa-se uma elevada taxa de translocação de elementos para o seu conteúdo. Esta característica poderá justificar a elevada concentração também de As no pólen.

De facto, a presença de elevadas concentrações de EPT no pólen podem representar um problema grave, quer para a saúde das plantas e dos polinizadores, quer para a saúde humana. Sendo essencial no processo de reprodução sexuada das plantas superiores com semente, quantidades excessivas de metais pesados no pólen, como é o caso da mina de Regoufe, podem afetar a fertilidade do pólen (Jonak et al., 2004; Kalbande et al., 2008) e com isso influenciar a reprodução de plantas superiores (Sawidis & Reiss, 1995). Também, os metais e metalóides quando transportados para o pólen, podem entrar na cadeia alimentar dos polinizadores, afetando, conseqüentemente, os serviços dos ecossistemas desempenhados pelos mesmos (Skaldina & Sorvari, 2019). Quando foi realizada a amostragem de pólen de Regoufe,

verificou-se a presença abundante de abelhas que recolham o pólen como fonte de proteínas, lípidos e outros nutrientes essenciais na sua dieta (Nicolson, 2011).

Por último, mas não menos importante, como visto inicialmente, grandes quantidades de pólen são libertadas para atmosfera como resultado do processo de polinização. Este aerossol atmosférico pode ser inalado e entrar assim nas vias respiratórias, provocando o desenvolvimento reações alérgicas (Ribeiro & Abreu, 2014). Este é um problema de saúde que afeta a qualidade de vida dos indivíduos por todo o mundo (Ring et al., 2012). Assim, o pólen transportado pela ar, para além de induzir reações de hipersensibilidade, pode concentrar teores de EPT acima dos limites considerados aceitáveis, agravando, deste modo, o risco de saúde humana, sobretudo na população localizada nas imediações da zona mineira.

## Capítulo 7

---

## Conclusões

## 7. Conclusões

Neste trabalho, amostras de solos, plantas e pólen recolhidas na antiga área mineira de Regoufe foram analisadas com o intuito de investigar como a variação nos níveis de contaminação do solo afeta a capacidade de bioacumulação de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) em *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L., assim como a contaminação influencia as propriedades do pólen de *Erica arborea* L.

No que diz respeito ao solo, as nossas amostras apresentaram um pH muito ácido, baixa condutividade elétrica, assim como baixo teor em matéria orgânica. A análise da composição química revelou a presença de EPT em concentrações elevadas, com destaque para o arsénio, tendo-se verificado, para a maioria dos elementos em estudo, excedência dos valores de referência mundial para solos.

No que se refere às plantas, os teores de EPT foram mais baixos ou muito próximos nos locais sob influência mineira comparativamente à amostra Controlo. A exceção foram os elementos As e Zn, em toda a área de influência mineira, e o Pb, na zona da lavaria, que estavam mais concentrados em todas as partes das plantas analisadas. A espécie *Calluna vulgaris* L. registou teores globais EPT mais elevados relativamente à espécie *Erica arborea* L., indicando assim um comportamento acumulador de metais mais eficaz. No entanto, ambas as espécies apresentaram na sua composição As e Pb, tendo-se observado uma tendência de bioacumulação nos diferentes órgãos das plantas, com maior concentração nos caules, seguido das folhas e, por fim, nas flores.

No pólen, os resultados revelaram diferenças estatisticamente significativas na sua germinação entre o local da Lavaria (um dos mais contaminados da área mineira) onde se obtiveram os valores mais baixos de germinação, e os outros locais que apresentaram taxas de germinação acima dos 55%. Da mesma forma, o teor de proteínas solúveis do pólen foi um dos mais baixos na Lavaria, com diferenças significativas entre todos os locais estudados. Em ambas as análises, o local da Galeria apresentou os valores mais elevados. Relativamente ao perfil proteico, as bandas características originadas mostraram um perfil semelhante em todos os locais de amostragem, embora se tenha observado uma menor intensidade de coloração das bandas na amostra correspondente à Lavaria. Por sua vez, a análise de microspectroscopia Raman não revelou alterações significativas na estrutura química da parede do pólen entre os locais. A composição química do pólen apresentou, assim como o solo, valores acima dos limites aceites na bibliografia indicada, com particular abundância do As. Além disso, enquanto as partes vegetativas da *Erica arborea* L.

registaram teores mais baixos dos elementos em comparação com o solo, o pólen contém concentrações mais elevadas, indicando a importância de estudar diferentes partes das plantas separadamente para uma compreensão mais completa dos seus comportamentos de acumulação.

Após todas as análises efetuadas conclui-se que as concentrações de EPT nas diferentes amostras se organizam como solos > pólen > plantas, e que, de entre os locais sob influência mineira, a Lavaria é, efetivamente, o local mais contaminado da área mineira de Regoufe, sendo o local de deposição de rejeitos mais finos exposto a menor contaminação.

Constata-se ainda uma presença em concentração elevada (acima dos limites aceitáveis) de arsénio para os 3 componentes em estudo (solos, plantas e pólen), o que pode revelar o seu contributo para potenciais riscos associados à área de estudo.

Apesar da análise estatística não ter mostrado a existência de correlação significativa entre os resultados obtidos no pólen, os parâmetros do solo e os teores de EPT nas folhas e caules da espécie *Erica arborea* L., a análise de Cluster exibiu uma clara discriminação entre a zona controlo e a área de influência mineira. Dentro desta área, a zona da Lavaria também se discriminava das restantes e corresponde ao local onde foram encontrados os valores mais baixos para as características polínicas analisadas e os níveis mais elevados da maioria dos EPT.

Esta contaminação pode provocar impactes negativos no ecossistema local, prejudicando a saúde das plantas, comprometendo as propriedades do pólen e, potencialmente, afetando a cadeia alimentar, podendo, consequentemente, colocar em risco a saúde humana.

---

## Referências Bibliográficas

## Referências Bibliográficas

- Abreu, M. M., Tavares, M. T., & Batista, M. J. (2008). Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: São Domingos, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, 96(2–3), 210–222.
- Adriano, D. C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments - Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer New York.
- Agbenin, J. O., & Olojo, L. A. (2004). Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. *Geoderma*, 119(1–2), 85–95.
- Aina, R., Asero, R., Ghiani, A., Marconi, G., Albertini, E., & Citterio, S. (2010). Exposure to cadmium-contaminated soils increases allergenicity of *Poa annua* L. pollen. *Allergy*, 65(10), 1313–1321.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881.
- Alloway, B. J. (2012). *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability* (Vol. 22). Springer Science & Business Media.
- Alvarenga, P., Laneiro, C., Palma, P., de Varennes, A., & Cunha-Queda, C. (2013). A study on As, Cu, Pb and Zn (bio) availability in an abandoned mine area (Sao Domingos, Portugal) using chemical and ecotoxicological tools. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 6539–6550.
- Álvarez-Ayuso, E., & Abad-Valle, P. (2017). Trace element levels in an area impacted by old mining operations and their relationship with beehive products. *Science of the Total Environment*, 599, 671–678.
- Antoniadis, V., Shaheen, S. M., Boersch, J., Frohne, T., Du Laing, G., & Rinklebe, J. (2017). Bioavailability and risk assessment of potentially toxic elements in garden edible vegetables and soils around a highly contaminated former mining area in Germany. *Journal of Environmental Management*, 186, 192–200.
- Antunes, I. M. H. R., Neiva, A. M. R., Albuquerque, M. T. D., Carvalho, P. C. S., Santos, A. C. T., & Cunha, P. P. (2018). Potential toxic elements in stream sediments, soils and waters in an abandoned radium mine (central Portugal). *Environmental Geochemistry and Health*, 40, 521–542.

- Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3(1–4), 643–654.
- Baker, A. J. M. (1987). Metal tolerance. *New Phytologist*, 106, 93–111.
- Bech, J., Poschenrieder, C., Barceló, J., & Lansac, A. (2002). Plants from mine spoils in the South American area as potential sources of germplasm for phytoremediation technologies. *Acta Biotechnologica*, 22(1-2), 5–11.
- Bhat, S. A., Bashir, O., Haq, S. A. U., Amin, T., Rafiq, A., Ali, M., Américo-Pinheiro, J. H. P., & Sher, F. (2022). Phytoremediation of heavy metals in soil and water: An eco-friendly, sustainable and multidisciplinary approach. *Chemosphere*, 303, 134788.
- Bist, A., Pandit, T., Bhatnagar, A. K., & Singh, A. B. (2004). Variability in protein content of pollen of Castor bean (*Ricinus communis*) before and after exposure to the air pollutants SO and NO. *Grana*, 43(2), 94–100.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bradl, H. B. (2004). Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277(1), 1–18.
- Callender, E. (2004). Heavy Metals in the Environmental - Historical trends. In, Holland, H.D. & Turekian, K.K. (Eds.) *Treatise on Geochemistry*, Vol 9 – Lollar, B.S. (Volume Editor) *Environmental Geochemistry*, 67-105
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161.
- Candeias, C., Ferreira da Silva, E., Salgueiro, A. R., Pereira, H. G., Reis, A. P., Patinha, C., Matos, J. X., & Ávila, P. H. (2011). The use of multivariate statistical analysis of geochemical data for assessing the spatial distribution of soil contamination by potentially toxic elements in the Aljustrel mining area (Iberian Pyrite Belt, Portugal). *Environmental Earth Sciences*, 62, 1461–1479.
- Carrington da Costa, J. (1950). *Notícia sobre uma carta geológica do Buçaco, de Nery Delgado*. Direcção Geral de Minas e Serviços Geológicos, Serviços Geológicos de Portugal.

- Castro, J. M. (1996). *Análise da estrutura ecológica de Trás-os-Montes e Alto Douro. Utilização de métodos de análise multivariada e teoria da informação*. Dissertação de mestrado em Ordenamento Rural em Função do Meio Ambiente. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Bragança.
- Costa, J. B. da. (2004). *Caracterização e constituição do solo* (7ª Edição). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cresti, M., & Linskens, H. F. (2000). Pollen-allergy as an ecological phenomenon: a review. *Plant Biosystems*, 134(3), 341–352.
- Cucu, A. A., Baci, G. M., Cucu, A. B., Dezsi, Ș., Lujerdean, C., Hegeduș, I. C., Bobiș, O., Moise, A. R., & Dezmirean, D. S. (2022). *Calluna vulgaris* as a valuable source of bioactive compounds: exploring its phytochemical profile, biological activities and apitherapeutic potential. *Plants*, 11(15), 1993.
- Da Silva, E. F., Fonseca, E. C., Matos, J. X., Patinha, C., Reis, P., & Santos Oliveira, J. M. (2005). The effect of unconfined mine tailings on the geochemistry of soils, sediments and surface waters of the Lousal area (Iberian Pyrite Belt, Southern Portugal). *Land Degradation & Development*, 16(2), 213–228.
- Das, M., & Maiti, S. K. (2007). Metal accumulation in *A. baccifera* growing naturally on abandoned copper tailings pond. *Environmental Monitoring and Assessment*, 127, 119–125.
- Delph, L. F., Johannsson, M. H., & Stephenson, A. G. (1997). How Environmental Factors Affect Pollen Performance: Ecological and Evolutionary Perspectives. *Ecology*, 78(6), 1632–1639.
- Ding, Q., Cheng, G., Wang, Y., & Zhuang, D. (2017). Effects of natural factors on the spatial distribution of heavy metals in soils surrounding mining regions. *Science of the Total Environment*, 578, 577–585.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Chlopecka, A., & Witek, T. (1995). Trace metal contamination of soils and crop plants by the mining and smelting industry in Upper Silesia, South Poland. *Journal of Geochemical Exploration*, 52(1–2), 237–250.
- Durães, N., Portela, L., Sousa, S., Patinha, C., & da Silva, E. F. (2021). Environmental Impact Assessment in the Former Mining Area of Regoufe (Arouca, Portugal): Contributions to Future Remediation Measures. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1180.

- Erdoğan, A., Şeker, M. E., & Kahraman, S. D. (2023). Evaluation of environmental and nutritional aspects of bee pollen samples collected from East Black Sea region, Turkey, via elemental analysis by ICP-MS. *Biological Trace Element Research*, 201(3), 1488–1502.
- Favas, P. J. C. (2008). *Biogeoquímica em áreas minerais estano-volframíticas*. Dissertação de doutoramento em Geologia. Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17(7), 8359–8377.
- Fernández, S., Poschenrieder, C., Marcenò, C., Gallego, J. R., Jiménez-Gámez, D., Bueno, A., & Afif, E. (2017). Phytoremediation capability of native plant species living on Pb-Zn and Hg-As mining wastes in the Cantabrian range, north of Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 174, 10–20.
- Fodoué, Y., Ismaila, A., Yannah, M., Wirmvem, M. J., & Mana, C. B. (2022). Heavy metal contamination and ecological risk assessment in soils of the Pawara gold mining area, eastern Cameroon. *Earth*, 3(3), 907–924.
- Fonseca, B., Durães, N., Patinha, C., & Dias, A. G. (2020). Caracterização de solos e sedimentos da mina abandonada de Rio de Frades (Arouca). *Comunicação Geológicas*, 107, 145–149.
- Fonseca, B. R. (2019). *Avaliação da contaminação associada às escombrelas das minas de Rio de Frades-Arouca*. Dissertação de mestrado em Geologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Gimingham, C. H. (1960). Biological flora of the British Isles. *Calluna Salisb*. A monotypic genus. *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Journal of Ecology*, 48(2), 455–483.
- Girão, A. (1922). *Bacia do Vouga - Estudo geográfico*.
- González-Parrado, Z., Fernández-González, D., Vega-Maray, A. M., & Valencia-Barrera, R. M. (2015). Relationship between flowering phenology, pollen production and atmospheric pollen concentration of *Plantago lanceolata* (L.). *Aerobiologia*, 31(4), 481–498.
- Guedes, A., Ribeiro, N., Ribeiro, H., Oliveira, M., Noronha, F., & Abreu, I. (2009). Comparison between urban and rural pollen of *Chenopodium alba* and

- characterization of adhered pollutant aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 40(1), 81–86.
- Helander, M. L., Savolainen, J., & Ahlholm, J. (1997). Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy*, 52(12), 1207–1214.
- Hiradate, S., & Uchida, N. (2004). Effects of soil organic matter on pH-dependent phosphate sorption by soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(5), 665–675.
- Hosseinpour, M., Osanloo, M., & Azimi, Y. (2022). Evaluation of positive and negative impacts of mining on sustainable development by a semi-quantitative method. *Journal of Cleaner Production*, 366, 132955.
- Huang, L. M., Deng, C. B., Huang, N., & Huang, X. J. (2013). Multivariate statistical approach to identify heavy metal sources in agricultural soil around an abandoned Pb–Zn mine in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. *Environmental Earth Sciences*, 68(5), 1331–1348.
- Iavazzo, P., Ducci, D., Adamo, P., Trifuoggi, M., Migliozzi, A., & Boni, M. (2012). Impact of past mining activity on the quality of water and soil in the High Moulouya Valley (Morocco). *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 573–589.
- ISO 10390. (2006). Standard of soil quality – Determination of pH. *International Organization for Standardization*, 7.
- ISO 11265. (1994). Soil quality - Determination of the specific electrical conductivity. *International Organization for Standardization*, 8.
- Johnson, C. K., Eigenberg, R. A., Doran, J. W., Wienhold, B. J., Eghball, B., & Woodbury, B. L. (2005). Status of soil electrical conductivity studies by central state researchers. *Transactions of the ASAE*, 48(3), 979–989.
- Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology*, 136(2), 3276–3283.
- Kabata-Pendias, A. (2010). Trace elements in soils and plants. In *Trace Elements in Soils and Plants* (4th ed.). CRC Press.
- Kalbande, D. M., Dhadse, S. N., Chaudhari, P. R., & Wate, S. R. (2008). Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 138, 233–238.

- Kendel, A., & Zimmermann, B. (2020). Chemical analysis of pollen by FT-Raman and FTIR spectroscopies. *Frontiers in Plant Science*, 11, 352.
- Kirpichtchikova, T. A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M. A., & Jacquet, T. (2006). Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9), 2163–2190.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015:297425.
- Kostarelos, K., Gavriel, I., Stylianou, M., Zissimos, A. M., Morisseau, E., & Dermatas, D. (2015). Legacy soil contamination at abandoned mine sites: making a case for guidance on soil protection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94, 269–274.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lau, T., Lu, X., Koide, R. T., & Stephenson, A. G. (1995). Effects of soil fertility and mycorrhizal infection on pollen production and pollen grain size of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Plant, Cell & Environment*, 18(2), 169–177.
- Lee, S. Z., Chang, L., Yang, H. H., Chen, C. M., & Liu, M. C. (1998). Adsorption characteristics of lead onto soils. *Journal of Hazardous Materials*, 63(1), 37–49.
- Liu, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of the Total Environment*, 633, 206–219.
- Lopes, J. T., Madeira, R. C., & Couto, S. M. (2022). O que pode a sociologia dizer sobre as antigas áreas mineiras? Um estudo sobre herança mineira, identidades locais coletivas e histórias orais. *SOCIOLOGIA ON LINE*, 30, 59–81.
- Loredo, J., Ordóñez, A., Charlesworth, S., & De Miguel, E. (2003). Influence of industry on the geochemical urban environment of Mieres (Spain) and associated health risk. *Environmental Geochemistry and Health*, 25, 307–323.
- Lottermoser, B. (2007). *Mine wastes*. Springer.
- Lottermoser, B. G., Glass, H. J., & Page, C. N. (2011). Sustainable natural remediation

- of abandoned tailings by metal-excluding heather (*Calluna vulgaris*) and gorse (*Ulex europaeus*), Carnon Valley, Cornwall, UK. *Ecological Engineering*, 37(8), 1249–1253.
- Lund, E. D., Christy, C. D., & Drummond, P. E. (1999). Practical applications of soil electrical conductivity mapping. *Precision Agriculture*, 99, 771–779.
- Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., & Shariatzade, M. A. (2004). The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains. *Aerobiologia*, 20, 111–118.
- Marks, R. H., & Bannister, P. (1978). The adaptation of *Calluna vulgaris* (L.) Hull to contrasting soil types. *New Phytologist*, 81(3), 753–761.
- Martins, J., Monteiro, P., Pinto, G., & Canhoto, J. (2021). Hybridization assays in strawberry tree toward the identification of plants displaying increased drought tolerance. *Forests*, 12(2), 148.
- Matanzas, N., Afif, E., Díaz, T. E., & Gallego, J. L. R. (2021). Screening of pioneer metallophyte plant species with phytoremediation potential at a severely contaminated Hg and As mining site. *Environments*, 8(7), 63.
- Mateus, J. E. (1989). Pollen morphology of Portuguese Ericales. *Revista de Biologia*, 14, 135–208.
- McKinney, J., & Chairman, W. (1993). Metals bioavailability and disposition kinetics research needs workshop July 18–19, 1990. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 38(1–2), 1–71.
- Monterroso, C., Rodríguez, F., Chaves, R., Diez, J., Becerra-Castro, C., Kidd, P. S., & Macías, F. (2014). Heavy metal distribution in mine-soils and plants growing in a Pb/Zn-mining area in NW Spain. *Applied Geochemistry*, 44, 3–11.
- Moura, A. (2005). Valorização do Património Geo-Mineiro da Serra da Freita (Norte de Portugal). In *Actas do IV Seminário de Recursos Geológicos, Ambiente e Ordenamento do Território*. Vila Real.
- Mukhopadhyay, S., & Maiti, S. K. (2010). Phytoremediation of metal mine waste. *Applied Ecology and Environmental Research*, 8(3), 207–222.
- Muradoglu, F., Beyhan, O., & Sonmez, F. (2017). Response to heavy metals on pollen viability, germination and tube growth of some apple cultivars. *Fresenius*

*Environmental Bulletin*, 26(7), 4456–4461.

Navarro, M. C., Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M. J., Vidal, J., Tovar, P. J., & Bech, J. (2008). Abandoned mine sites as a source of contamination by heavy metals: a case study in a semi-arid zone. *Journal of Geochemical Exploration*, 96(2–3), 183–193.

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46(2), 197–204.

Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11173–11187.

Noronha, F. (2006). Especialização metalogenética das rochas graníticas da ZCI. *Livro de Resumos Do VII Congresso Nacional de Geologia*, 1239–1241.

Nouri, J., Khorasani, N., Lorestani, B., Karami, M., Hassani, A. H., & Yousefi, N. (2009). Accumulation of heavy metals in soil and uptake by plant species with phytoremediation potential. *Environmental Earth Sciences*, 59, 315–323.

Oliveira, D., Ramalho, E., Santana, H., Falé, P., & Henriques, P. (2007). *Os Recursos Minerais na nossa vida*. Lisboa: INETI-Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação.

Oliveira, J. M. S., Farinha, J., Matos, J. . X., Ávila, P., Rosa, C., Machado, M. J. C., Daniel, F. S., Martins, L., & Leite, M. R. M. (2002). Diagnóstico ambiental das principais áreas mineiras degradadas do país. *Boletim de Minas*, 39, 67–85.

Oteros, J., García-Mozo, H., Vázquez, L., Mestre, A., Domínguez-Vilches, E., & Galán, C. (2013). Modelling olive phenological response to weather and topography. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 179, 62–68.

Parui, S., Mondal, A. K., & Mandal, S. (1998). *Protein content and patient skin test sensitivity of the pollen of Argemone mexicana on exposure to SO<sub>2</sub>*. *Grana*, 37(2), 121–124.

Pereira, M. R., Ribeiro, H., Cunha, M., & Abreu, I. (2018). Comparison of pollen quality in *Vitis vinifera* L. cultivars. *Scientia Horticulturae*, 227, 112–116.

Pereira, S., Fernández-González, M., Guedes, A., Abreu, I., & Ribeiro, H. (2021). The Strong and the Stronger: The Effects of Increasing Ozone and Nitrogen Dioxide

- Concentrations in Pollen of Different Forest Species. *Forests*, 12(1), 88.
- Pereira, S. G., Guedes, A., Abreu, I., & Ribeiro, H. (2021). Testing the Raman parameters of pollen spectra in automatic identification. *Aerobiologia*, 37, 15–28.
- Pinto, M. (1985). Granitóides dos Maciços de Arouca e Regoufe: dados geoquímicos e isotópicos e algumas implicações. *Comunicações Dos Serviços Geológicos de Portugal*, 71(2), 159–169.
- Popescu, I. V, Dima, G., & Dinu, S. (2010). The content of heavy metals in pollen from Dambovită region. *Journal of Science and Arts*, 10(2), 171.
- Pratas, J., Prasad, M. N. V, Freitas, H., & Conde, L. (2005). Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*, 85(3), 99–107.
- Puc, M. (2003). Characterisation of pollen allergens. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10(2):143–149.
- Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Chazallon, B., Facq, S., Lendl, B., Whitmore, K., & Grothe, H. (2013). Chemistry and morphology of dried-up pollen suspension residues. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(12), 1654–1658.
- Rapoport, H. F., Hammami, S. B. M., Martins, P., Pérez-Priego, O., & Orgaz, F. (2012). Influence of water deficits at different times during olive tree inflorescence and flower development. *Environmental and Experimental Botany*, 77, 227–233.
- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., & Monroy, M. (2004). Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 152, 129–152.
- Reiss, H. D., Herth, W., Schnepf, E., & Nobiling, R. (1983). The tip-to-base calcium gradient in pollen tubes of *Lilium longiflorum* measured by proton-induced X-ray emission (PIXE). *Protoplasma*, 115, 153–159.
- Reyes, A., Cuevas, J., Fuentes, B., Fernández, E., Arce, W., Guerrero, M., & Letelier, M. V. (2021). Distribution of potentially toxic elements in soils surrounding abandoned mining waste located in Taltal, Northern Chile. *Journal of Geochemical Exploration*, 220, 106653.
- Rezanejad, F. (2009). Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L.(Cupressaceae). *Grana*, 48(3), 205–213.

- Rezanejad, F., Majd, A., Shariatzadeh, S. M. A., Moein, M., Aminzadeh, M., & Mirzaeian, M. (2003). Effect of air pollution on soluble proteins, structure and cellular material release in pollen of *Lagerstroemia indica* L. (Lytraceae). *Acta Biologica Cracoviensia Botanica*, 45(1), 129–132.
- Ribeiro, H., & Abreu, I. (2014). A 10-year survey of allergenic airborne pollen in the city of Porto (Portugal). *Aerobiologia*, 30, 333–344.
- Ribeiro, H., Duque, L., Sousa, R., & Abreu, I. (2013). Ozone effects on soluble protein content of *Acer negundo*, *Quercus robur* and *Platanus* spp. pollen. *Aerobiologia*, 30, 443–447.
- Ribeiro, O., Almeida, J. P., & Patrício, A. (1943). Nota preliminar sobre a morfologia do maciço da Gralheira. *Boletim Da Sociedade Geológica de Portugal*, 3, 82–85.
- Ring, J., Akdis, C., Behrendt, H., Lauener, R. P., Schäppi, G., Akdis, M., Ammann, W., de Beaumont, O., Bieber, T., & Bienenstock, J. (2012). Davos declaration: allergy as a global problem. In *Allergy*, 67(2), 141–143.
- Ross, S. M. (1994). *Toxic metals in soil-plant systems*. John Wiley and Sons Ltd.
- Sá, A. A., & Rocha, D. (2020). Arouca UNESCO Global Geopark: Geomorphological Diversity Fosters Local Development. In: Vieira, G., Zázere, J., Mora, C. (eds) *Landscapes and Landforms of Portugal*. World Geomorphological Landscapes. Springer, Cham.
- Sabreena, Hassan, S., Bhat, S. A., Kumar, V., Ganai, B. A., & Ameen, F. (2022). Phytoremediation of heavy metals: An indispensable contrivance in green remediation technology. *Plants*, 11(9), 1255.
- Sabrine, H., Afif, H., Mohamed, B., Hamadi, B., & Maria, H. (2010). Effects of cadmium and copper on pollen germination and fruit set in pea (*Pisum sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 125(4), 551–555.
- Sant’Ovaia, H., Cruz, C., Guedes, A., Ribeiro, H., Santos, P., Pereira, S., Espinha Marques, J., Ribeiro, M. dos A., Mansilha, C., & Martins, H. C. B. (2023). Contamination Fingerprints in an Inactive W (Sn) Mine: The Regoufe Mine Study Case (Northern Portugal). *Minerals*, 13(4), 497.
- Satta, A., Verdinelli, M., Ruiu, L., Buffa, F., Salis, S., Sassu, A., & Floris, I. (2012). Combination of beehive matrices analysis and ant biodiversity to study heavy metal pollution impact in a post-mining area (Sardinia, Italy). *Environmental Science and*

*Pollution Research*, 19, 3977–3988.

- Sawidis, T. (2008). Effect of cadmium on pollen germination and tube growth in *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*, 233, 95–106.
- Sawidis, T., & Reiss, H. D. (1995). Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma*, 185(3), 113–122.
- Schulte, F., Lingott, J., Panne, U., & Kneipp, J. (2008). Chemical characterization and classification of pollen. *Analytical Chemistry*, 80(24), 9551–9556.
- Schulze, D. G., Nagel, J. L., Van Scoyoc, G. E., Henderson, T. L., Baumgardner, M. F., & Stott, D. E. (1993). Significance of organic matter in determining soil colors. *Soil Color*, 31, 71–90.
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J. P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., & Malrat-Domenge, A. (2015). A review of the effects of major atmospheric pollutants on pollen grains, pollen content, and allergenicity. *The Scientific World Journal*, 2015:940243.
- Sharma, C. P. (2006). *Plant micronutrients*. CRC Press.
- Silva, A. M. S. P., & Ribeiro, M. C. S. (2006). Os complexos mineiros de Regoufe e Rio de Frades (Arouca, Portugal)–Memórias da contemporaneidade. *Actas 3º Simpósio Sobre Mineração e Metalurgia Históricas No Sudoeste Europeu*, 353–369.
- Skaldina, O., & Sorvari, J. (2019). Ecotoxicological Effects of Heavy Metal Pollution on Economically Important Terrestrial Insects. In: Kesari, K. (eds) *Networking of Mutagens in Environmental Toxicology*. Environmental Science and Engineering. Springer, Cham.
- Soil Science Division Staff. (2017). *Soil survey manual* (C. Ditzler, K. Scheffe, & H. C. Monger (eds.)). USDA Handbook 18. Government Printing Office.
- Sousa, R., Duque, L., Duarte, A. J., Gomes, C. R., Ribeiro, H., Cruz, A., Esteves da Silva, J. C. G., & Abreu, I. (2012). In vitro exposure of *Acer negundo* pollen to atmospheric levels of SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub>: effects on allergenicity and germination. *Environmental Science & Technology*, 46(4), 2406–2412.
- Sousa, S. C. S. (2016). *Avaliação do impacte ambiental das minas de volfrâmio de Regoufe - Arouca*. Dissertação de mestrado em Engenharia Geológica. Universidade de Aveiro.

- Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (2012). *Pollen: biology biochemistry management*. Springer Science & Business Media.
- Tavares, J. I. S. S. (2006). *Geologia da região de Regoufe*. Dissertação de mestrado em Ensino de Geologia e Biologia. Universidade de Aveiro.
- Teixeira, C. (1955). *Notas sobre Geologia de Portugal: O complexo xisto-grauváquico ante-ordovícico*. Empresa Literária Fluminense, Lisboa.
- Thornton, I. (1996). Impacts of mining on the environment; some local, regional and global issues. *Applied Geochemistry*, 11(1–2), 355–361.
- Tóth, G., Hermann, T., Szatmári, G., & Pásztor, L. (2016). Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Science of the Total Environment*, 565, 1054–1062.
- Traina, S. J., & Laperche, V. (1999). Contaminant bioavailability in soils, sediments, and aquatic environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3365–3371.
- Ullrich, S. M., Ramsey, M. H., & Helios-Rybicka, E. (1999). Total and exchangeable concentrations of heavy metals in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in Upper Silesia, Poland. *Applied Geochemistry*, 14(2), 187–196.
- Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181(4), 759–776.
- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., & Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184, 594–600.
- Wang, X., Gao, Y., Feng, Y., Li, X., Wei, Q., & Sheng, X. (2014). Cadmium stress disrupts the endomembrane organelles and endocytosis during *Picea wilsonii* pollen germination and tube growth. *PLoS One*, 9(4): e94721.
- Węglińska, M., Szostak, R., Kita, A., Nemš, A., & Mazurek, S. (2020). Determination of nutritional parameters of bee pollen by Raman and infrared spectroscopy. *Talanta*, 212, 120790.
- Whiting, S. N., Reeves, R. D., Richards, D., Johnson, M. S., Cooke, J. A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J. A. C., Angle, J. S., & Chaney, R. L. (2004). Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology*, 12(1), 106–116.

- Wu, S., Peng, S., Zhang, X., Wu, D., Luo, W., Zhang, T., Zhou, S., Yang, G., Wan, H., & Wu, L. (2015). Levels and health risk assessments of heavy metals in urban soils in Dongguan, China. *Journal of Geochemical Exploration*, 148, 71–78.
- Yang, X., Chen, X., & Yang, X. (2019). Effect of organic matter on phosphorus adsorption and desorption in a black soil from Northeast China. *Soil and Tillage Research*, 187, 85–91.
- Yousefi, N., Chehregani, A., Malayeri, B., Lorestani, B., & Cheraghi, M. (2011). Investigating the effect of heavy metals on developmental stages of anther and pollen in *Chenopodium botrys* L.(Chenopodiaceae). *Biological Trace Element Research*, 140, 368–376.



## Anexo 1 – Soluções químicas

|                                                           |                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Solução-Tampão de Extração PBS</b><br>(250 mL; pH 7,4) | 0,05 g Cloreto de Potássio<br>2,00 g Cloreto de Sódio<br>0,06 g Fosfato Monopotássico<br>0,36 g Hidrogenofosfato Dissódico Dihidratado           |
| <b>Gel Separador</b>                                      | 3,38 mL H <sub>2</sub> O<br>3,17 mL Tris (pH 8,8)<br>5,21 mL Acrilamida<br>125 µL SDS (10%)<br>125 µL APS<br>10 µL TEMED (catalisador)           |
| <b>Gel Concentrador</b>                                   | 2,25 mL H <sub>2</sub> O<br>1,00 mL Tris (pH 6,8)<br>0,67 mL Acrilamida<br>40 µL SDS (10%)<br>40 µL APS<br>12,5 µL TEMED (adicionar rapidamente) |
| <b>Tampão de Eletroforese</b><br>(1 L)                    | 3,03 g Tris<br>14,42 g Glicina<br>10 mL Solução Stock SDS (10%, pH 8,3)                                                                          |
| <b>Fixação</b><br>(100 mL)                                | 40 mL Metanol<br>10 mL Ácido Acético                                                                                                             |
| <b>Coloração</b>                                          | 0,125% Coomassie R<br>50% Metanol<br>10% Ácido Acético                                                                                           |
| <b>Descoloração</b><br>(500 mL)                           | 25 mL Metanol<br>37,5 mL Ácido Acético<br>10 mL Glicerol (99,5%)                                                                                 |

## Anexo 2 – Valores obtidos por XRF

Tabela 6 - Concentração dos elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras de flores, folhas e caules das espécies *Erica arborea* L. e *Calluna vulgaris* L. . Valores obtidos por XRF – método mining (M) e soils (S) (n.d. – não detetado).

| Local                   |         |   | Elementos analisados por XRF (ppm = mg/kg) |        |       |      |    |      |    |      |      |
|-------------------------|---------|---|--------------------------------------------|--------|-------|------|----|------|----|------|------|
| <i>Erica arborea</i> L. |         |   | As                                         | Mn     | Zn    | Cu   | Cr | Ni   | Pb | Cd   | Co   |
| Controlo                | Folhas  | M | 0                                          | 36891  | 11168 | 0    | 0  | 0    | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 976    | 230   | 0    | 0  | 0    | 25 |      | 0    |
|                         | Caules  | M | 0                                          | 39019  | 10990 | 1337 | 0  | 1345 | 0  | n.d. | 2612 |
|                         |         | S | 0                                          | 860    | 167   | 12   | 0  | 0    | 20 |      | 0    |
|                         | Lavaría | M | 0                                          | 58941  | 2895  | 1418 | 0  | 1959 | 0  | n.d. | 2066 |
|                         |         | S | 0                                          | 1339   | 45    | 13   | 0  | 11   | 19 |      | 0    |
| Galeria                 | Folhas  | M | 0                                          | 76788  | 3715  | 1473 | 0  | 0    | 0  | n.d. | 2050 |
|                         |         | S | 0                                          | 2074   | 52    | 22   | 0  | 0    | 16 |      | 0    |
|                         | Caules  | M | 0                                          | 17863  | 7960  | 983  | 0  | 0    | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 439    | 148   | 12   | 0  | 0    | 21 |      | 0    |
|                         | R1      | M | 0                                          | 17683  | 5993  | 1557 | 0  | 0    | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 379    | 87    | 19   | 0  | 0    | 21 |      | 0    |
| Perto água              | Folhas  | M | 0                                          | 27984  | 12459 | 0    | 0  | 0    | 0  |      | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 714    | 216   | 0    | 0  | 0    | 26 | n.d. | 0    |
|                         | Caules  | M | 0                                          | 37530  | 5949  | 1910 | 0  | 1301 | 0  | n.d. | 2678 |
|                         |         | S | 0                                          | 880    | 94    | 21   | 0  | 0    | 26 |      | 0    |
|                         | Folhas  | M | 0                                          | 7878   | 8125  | 1182 | 0  | 921  | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 189    | 144   | 0    | 0  | 0    | 29 |      | 0    |
| Calluna vulgaris L.     | Folhas  | M | 0                                          | 10693  | 5637  | 0    | 0  | 0    | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 277    | 90    | 14   | 0  | 0    | 20 |      | 0    |
|                         | Caules  | M | 0                                          | 18880  | 71    | 13   | 0  | 0    | 34 | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 500    | 3895  | 0    | 0  | 0    | 0  |      | 0    |
|                         | Lavaría | M | 0                                          | 33134  | 307   | 0    | 0  | 0    | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 1480   | 102   | 0    | 0  | 0    | 70 |      | 0    |
| Controlo                | Folhas  | M | 0                                          | 51393  | 40    | 13   | 0  | 0    | 16 | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 142367 | 2046  | 830  | 0  | 0    | 0  |      | 0    |
|                         | Caules  | M | 0                                          | 68512  | 1861  | 0    | 0  | 0    | 0  | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 2923   | 68    | 14   | 0  | 0    | 18 |      | 0    |
|                         | Lavaría | M | 0                                          | 51393  | 40    | 13   | 0  | 0    | 16 | n.d. | 0    |
|                         |         | S | 0                                          | 142367 | 2046  | 830  | 0  | 0    | 0  |      | 0    |

|                   |               |          |   |       |      |     |   |   |    |      |   |
|-------------------|---------------|----------|---|-------|------|-----|---|---|----|------|---|
| <b>Galeria</b>    | <b>Folhas</b> | <b>M</b> | 0 | 15070 | 86   | 13  | 0 | 0 | 19 | n.d. | 0 |
|                   |               | <b>S</b> | 0 | 392   | 4153 | 0   | 0 | 0 | 0  |      | 0 |
|                   | <b>Caules</b> | <b>M</b> | 0 | 26601 | 4941 | 0   | 0 | 0 | 0  | n.d. | 0 |
|                   |               | <b>S</b> | 0 | 1100  | 183  | 14  | 0 | 0 | 51 |      | 0 |
| <b>R1</b>         | <b>Folhas</b> | <b>M</b> | 0 | 44418 | 64   | 15  | 0 | 0 | 22 | n.d. | 0 |
|                   |               | <b>S</b> | 0 | 1121  | 2961 | 739 | 0 | 0 | 0  |      | 0 |
|                   | <b>Caules</b> | <b>M</b> | 0 | 63424 | 3158 | 429 | 0 | 0 | 0  | n.d. | 0 |
|                   |               | <b>S</b> | 0 | 3751  | 138  | 0   | 0 | 0 | 56 |      | 0 |
| <b>Perto água</b> | <b>Folhas</b> | <b>M</b> | 0 | 22011 | 71   | 13  | 0 | 0 | 18 | n.d. | 0 |
|                   |               | <b>S</b> | 0 | 663   | 2843 | 581 | 0 | 0 | 0  |      | 0 |
|                   | <b>Caules</b> | <b>M</b> | 0 | 21533 | 4462 | 0   | 0 | 0 | 0  | n.d. | 0 |
|                   |               | <b>S</b> | 0 | 927   | 134  | 0   | 0 | 0 | 28 |      | 0 |

Tabela 7 - Concentração dos elementos potencialmente tóxicos - EPT (mg/kg) medida nas amostras do pólen da espécie *Erica arborea* L. . Valores obtidos por XRF – método mining (M) e soils (S) (n.d. – não detetado).

| <b>Local</b>      |          | <b>Elementos analisados por XRF (ppm = mg/kg)</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |
|-------------------|----------|---------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                   |          | <b>As</b>                                         | <b>Mn</b> | <b>Zn</b> | <b>Cu</b> | <b>Cr</b> | <b>Ni</b> | <b>Pb</b> | <b>Cd</b> | <b>Co</b> |
| <b>Controlo</b>   | <b>M</b> | n.d.                                              | 21502     | 3575      | 1186      | n.d.      | 0         | 0         | n.d.      | 0         |
|                   | <b>S</b> | n.d.                                              | 1063      | 136       | 40        | n.d.      | 0         | 11        | n.d.      | 0         |
| <b>Lavaria</b>    | <b>M</b> | n.d.                                              | 11105     | 2590      | 684       | n.d.      | 0         | 0         | n.d.      | 0         |
|                   | <b>S</b> | n.d.                                              | 661       | 97        | 29        | n.d.      | 0         | 29        | n.d.      | 0         |
| <b>Galeria</b>    | <b>M</b> | n.d.                                              | 6061      | 4385      | 763       | n.d.      | 0         | 0         | n.d.      | 0         |
|                   | <b>S</b> | n.d.                                              | 384       | 159       | 29        | n.d.      | 0         | 12        | n.d.      | 0         |
| <b>R1</b>         | <b>M</b> | n.d.                                              | 16883     | 3906      | 990       | n.d.      | 0         | 0         | n.d.      | 0         |
|                   | <b>S</b> | n.d.                                              | 834       | 160       | 37        | n.d.      | 0         | 20        | n.d.      | 0         |
| <b>Perto água</b> | <b>M</b> | n.d.                                              | 4765      | 2283      | 394       | n.d.      | 0         | 0         | n.d.      | 0         |
|                   | <b>S</b> | n.d.                                              | 343       | 99        | 16        | n.d.      | 0         | 14        | n.d.      | 0         |