

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA



MESTRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE METAIS EM
SOLOS CONTAMINADOS POR ATIVIDADES MINEIRAS:
MÉTODOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E
ECOTOXICOLÓGICOS**

Cátia Filipa Martins Laneiro

Orientadora: Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga

BEJA, 2012

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA



MESTRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE METAIS EM
SOLOS CONTAMINADOS POR ATIVIDADES MINEIRAS:
MÉTODOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E
ECOTOXICOLÓGICOS**

Cátia Filipa Martins Laneiro

Orientadora: Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga

Dissertação apresentada no âmbito do trabalho de estágio, para a obtenção do grau de Mestre.

BEJA, 2012

Dedicada aos meus pais Maria das Neves e José Pedro,
responsáveis pela pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho foi necessário o contributo de diversas partes a quem quero prestar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga pela oportunidade de realizar a tese de mestrado na área da Proteção e Reabilitação de Solos e na qualidade de orientadora deste trabalho, pelo seu saber científico transmitido, pelos seus conselhos e orientação, motivação, críticas sempre construtivas e sugestões de melhoria ao longo de todo o trabalho, tornando possível que os objetivos deste fossem alcançados.

À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja (ESAB), pela possibilidade que me concedeu de realizar o trabalho experimental conducente à elaboração desta dissertação no Laboratório de Ecotoxicologia e Fitorremediação, disponibilizando todos os meios laboratoriais para a sua execução física.

À Técnica Mariana Raposo, da ESAB, pela qualidade do seu trabalho analítico na realização das análises de metais por espectrofotometria de absorção atómica.

Aos funcionários, técnicos, docentes e não docentes da Área Departamental de Ciências do Ambiente da ESAB, pelo seu auxílio no esclarecimento de dúvidas ao longo do trabalho laboratorial.

Aos meus pais e irmão, amigos eternos, a quem devo todo o meu percurso académico em todas as suas vertentes, e ao meu namorado por toda a motivação e força dada em todas as alturas.

À família Gonçalves, que foi minha referência de lar e sempre me acolheu quando foi necessária uma estadia mais prolongada.

Finalmente, a todos os que direta ou indiretamente tenham contribuído para a realização deste trabalho.

«As minas abandonadas são, na maior parte das vezes, deixadas no esquecimento e abandono, sendo vistas como “feridas” abertas na terra, originando um impacto visual negativo e constituindo em muitos casos, fonte de insegurança e poluição para as zonas envolventes».

RESUMO

É reconhecido que a avaliação dos riscos ambientais efetuada com base na concentração total de um contaminante pode sobrestimar os riscos, e que os organismos respondem apenas à fração do contaminante que se encontra biologicamente disponível. É, por isso, muito importante entender se os resultados obtidos por métodos químicos traduzem a biodisponibilidade ambiental de determinado contaminante, e se ela se relaciona com a observação dos efeitos em organismos expostos.

Neste estudo foram utilizados solos afetados pela atividade mineira em São Domingos (Faixa Piritosa Ibérica – Portugal), considerando: (i) caracterização físico-química geral; (ii) concentração de As, Cu, Pb e Zn totais, potencial e efectivamente biodisponíveis; (iii) avaliação ecotoxicológica (germinação com *Lactuca sativa* L., mortalidade e reprodução de *Eisenia fetida*); (iv) bioacumulação de As, Cu, Pb e Zn por *E. fetida*, após 28 dias de exposição aos solos contaminados; (v) concentração de As, Cu, Pb e Zn em plantas existentes no local (*Cistus ladanifer* L. e *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera); e (vi) atividades enzimáticas dos solos.

Ficou demonstrado que, embora a biodisponibilidade ambiental para um determinado organismo possa ser prevista através de um método de extração química, tendo-se encontrado valores de As, Cu, Pb e Zn potencialmente biodisponíveis (extraídos com uma solução 0,5 M em $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 0,5 M em CH_3COOH e 0,02M em EDTA, pH 4,7) que se correlacionaram com os teores bioacumulados pela *E. fetida*, a resposta tóxica (biodisponibilidade toxicológica), não foi a esperada. De facto, as respostas obtidas nos diferentes bioensaios sofreram uma influência muito grande de outras características do solo, que não o seu teor em As, Cu, Pb e Zn totais e/ou biodisponíveis, (e.g. pH, teor em matéria orgânica, teor em macronutrientes essenciais, capacidade de troca catiónica), tornando bastante difícil o estabelecimento de uma relação entre a biodisponibilidade ambiental e a biodisponibilidade toxicológica.

Por esse facto, quando se avalia o risco em solos com uma contaminação antropogénica mais complexa, com características físico-químicas distintas de local para local, a avaliação da biodisponibilidade utilizando ensaios químicos deve ser complementada com a utilização de bioensaios; só eles nos permitem ter uma visão holística mais significativa dos riscos de locais contaminados.

Palavras-chave: Faixa Piritosa Ibérica, Mina de São Domingos, avaliação de risco ambiental, As, Cu, Pb, Zn, biodisponibilidade, bioacumulação, bioensaios.

ABSTRACT

It is recognized that the environmental risk assessment carried out based on the total concentration of a contaminant may overestimate the risks, and that organisms respond only to the fraction of contaminant that is biologically available. It is therefore very important to understand if the results obtained by chemical methods reflect the bioavailability of certain environmental contaminants, and if it relates to the observation of the effects on exposed organisms.

This study used soils affected by mining activities in São Domingos (Iberian Pyrite Belt - Portugal), considering: (i) general physicochemical characterization, (ii) concentration of As, Cu, Pb and Zn total, potential and effective bioavailable; (iii) ecotoxicological assessment (*Lactuca sativa* L. germination, mortality and reproduction of *Eisenia fetida*), (iv) bioaccumulation of As, Cu, Pb and Zn by *E. fetida* after 28 days of exposure to contaminated soils, (v) concentration of As, Cu, Pb and Zn in endemic plants (*Cistus ladanifer* L. and *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera), and (vi) soil enzyme activities.

It was demonstrated that although the environmental bioavailability for a particular organism may be provided by a method of chemical extraction, because the potentially bioavailable concentrations for As, Cu, Pb and Zn (extracted with a solution 0,5 M in $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 0,5 M in CH_3COOH and 0,02 M in EDTA, pH 4,7) were significantly correlated with the bioaccumulation of the same elements by *E. fetida*, the obtained toxic response (toxicological bioavailability) was not the expected. In fact, the responses obtained in the different bioassays were greatly influenced by other soil characteristics besides their As, Cu, Pb and Zn total and/or bioavailable content (*e.g.* pH, organic matter content, content essential macronutrients, cation exchange capacity), making it difficult to establish a relationship between the environmental bioavailability and toxicological bioavailability.

For this reason, when assessing the risk in soils with a more complex anthropogenic contamination, with different physicochemical characteristics from place to place, the evaluation of bioavailability using chemical tests should be complemented with the use of bioassays; only they provide a more holistic view of the risks of contaminated sites.

Keywords: Iberian Pyrite Belt, Mina de São Domingos, environmental risk assessment, As, Cu, Pb, Zn, bioavailability, bioaccumulation bioassays.

ÍNDICE

| | |
|---|-------|
| ÍNDICE | xv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xviii |
| ÍNDICE DE TABELAS | xx |
| SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES | xxii |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 1.1. Considerações iniciais..... | 1 |
| 1.2. Objetivos | 3 |
| 1.3. Organização do estudo | 4 |
| 2. CONTAMINAÇÃO EM ÁREAS MINEIRAS DO SETOR PORTUGUÊS DA FAIXA PIRITOSA IBÉRICA | 5 |
| 2.1. Contaminação e impacte ambiental das áreas mineiras no setor português da FPI..... | 7 |
| 2.2. Enquadramento legal e institucional..... | 8 |
| 2.3. Programas de recuperação ambiental..... | 9 |
| 3. PROPRIEDADES DOS SOLOS EM ZONAS MINEIRAS | 11 |
| 3.1. Propriedades físicas | 11 |
| 3.2. Propriedades químicas | 13 |
| 3.3. Propriedades biológicas | 14 |
| 3.4. Comportamento dos metais no solo..... | 14 |
| 3.4.1. Fatores que influenciam a biodisponibilidade do metal | 16 |
| 3.4.2. Processos que influenciam a mobilidade e biodisponibilidade dos metais no solo | 17 |
| 3.4.3. Toxicidade e tolerância aos metais nas plantas | 19 |
| 3.4.3.1. Toxicidade..... | 19 |
| 3.4.3.2. Tolerância..... | 20 |
| 4. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SOLO | 21 |
| 4.1. Funções do solo | 22 |
| 4.2. Biodisponibilidade | 24 |
| 4.2.1. Definições de biodisponibilidade | 25 |
| 4.2.2. Relação entre biodisponibilidade e efeito biológico e/ou bioacumulação | 27 |
| 4.2.3. Avaliação da biodisponibilidade | 29 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.3.1. | Utilização de métodos químicos na avaliação da (bio)disponibilidade ambiental | 29 |
| 4.2.3.2. | Utilização de métodos ecotoxicológicos na avaliação da biodisponibilidade toxicológica | 30 |
| 4.2.3.3. | Ensaio ecotoxicológicos que utilizam plantas | 31 |
| 4.2.3.4. | Ensaio ecotoxicológicos que utilizam a fauna do solo | 32 |
| 4.2.3.5. | Utilização de métodos bioquímicos na avaliação da qualidade do solo | 33 |
| 5. | CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA MINEIRA EM ESTUDO | 37 |
| 5.1. | A Mina de São Domingos..... | 37 |
| 5.2. | Enquadramento histórico da Mina de São Domingos | 38 |
| 5.3. | Contaminação dos solos na zona mineira de São Domingos..... | 41 |
| 6. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 6.1. | Área de estudo | 43 |
| 6.2. | Amostragem..... | 43 |
| 6.3. | Secagem do solo ao ar | 47 |
| 6.4. | Crivagem e determinação da % da fração fina | 48 |
| 6.5. | Análises físico-químicas de solos | 48 |
| 6.5.1. | Determinação da humidade residual..... | 48 |
| 6.5.2. | Determinação do pH (H ₂ O) | 49 |
| 6.5.3. | Determinação da condutividade elétrica..... | 49 |
| 6.5.4. | Determinação do teor em matéria orgânica..... | 50 |
| 6.5.5. | Capacidade de troca catiónica | 51 |
| 6.5.6. | Determinação do teor em fósforo e potássio “assimiláveis” | 52 |
| 6.5.7. | Determinação do azoto total (Kjeldahl)..... | 53 |
| 6.5.8. | Doseamento dos metais totais – Digestão com água régia..... | 55 |
| 6.5.8.1. | Avaliação da biodisponibilidade dos metais utilizando métodos químicos | 55 |
| 6.5.8.2. | Biodisponibilidade efectiva..... | 56 |
| 6.5.8.3. | Biodisponibilidade potencial..... | 56 |
| 6.6. | Ensaio ecotoxicológicos | 57 |
| 6.6.1. | Ensaio de mortalidade com <i>Eisenia fetida</i> | 58 |
| 6.6.2. | Ensaio de reprodução usando <i>E. fetida</i> | 58 |
| 6.6.3. | Ensaio de germinação com <i>Lactuca Sativa L.</i> | 59 |
| 6.6.4. | Determinação dos metais acumulados nas minhocas (bioacumulação) | 59 |
| 6.7. | Ensaio enzimáticos | 60 |
| 6.7.1. | β–Glucosidase..... | 60 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.7.2. | Fosfatases ácidas | 61 |
| 6.7.3. | Urease | 61 |
| 6.7.4. | Desidrogenase..... | 61 |
| 6.8. | Análises às plantas | 62 |
| 6.8.1. | Digestão de amostras de plantas para a determinação dos metais totais | 62 |
| 6.9. | Tratamento estatístico dos resultados | 62 |
| 7. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 7.1. | Análises físico-químicas | 64 |
| 7.2. | Teor em metais nos solos | 68 |
| 7.3. | Avaliação da ecotoxicidade do solo..... | 73 |
| 7.3.1. | Ensaio de mortalidade com <i>E. fetida</i> | 73 |
| 7.3.2. | Ensaio de reprodução com <i>E. fetida</i> | 74 |
| 7.3.3. | Ensaio de germinação com <i>L. sativa</i> | 75 |
| 7.3.4. | Bioacumulação de metais pesados por <i>E. fetida</i> | 77 |
| 7.4. | Atividades enzimáticas do solo..... | 81 |
| 7.5. | Metais totais nas plantas | 84 |
| 8. | CONCLUSÃO | 90 |
| 9. | BIBLIOGRAFIA | 94 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos no setor português da Faixa Piritosa Ibérica (Matos e Oliveira, 2003)..... | 5 |
| Figura 2. Equilíbrio dinâmico dos metais no solo (adaptado de Alloway (1995) e de Domingues (1999))..... | 17 |
| Figura 3. Da concentração total no solo ao efeito (adaptado de ISO/DIS 17402, 2006; Harmsen, 2007). | 26 |
| Figura 4. Representação da resposta de um ensaio químico e de um bioensaio à concentração total do contaminante (adaptado de ISO/DIS 17402, 2006)..... | 28 |
| Figura 5. Localização da Mina de São Domingos no setor Português da Faixa Piritosa Ibérica (adaptado por Álvarez-Valero <i>et al.</i> , 2008)..... | 37 |
| Figura 6. (A) Escórias e escombrelras resultantes da extração mineira, e (B) curso de água junto à Achada do Gamo (Mina de São Domingos) onde é visível a influência da drenagem ácida..... | 42 |
| Figura 7. Mapa da área mineira de São Domingos com a localização dos pontos de amostragem (solo e plantas) (imagem tratada a partir de uma imagem do <i>Google Earth</i>)..... | 44 |
| Figura 8. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) Vista geral do local de amostragem 1, e (B) vista detalhada do local de amostragem da planta <i>Erica andevalensis</i> | 44 |
| Figura 9. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) Vista geral do local de amostragem 2, e (B) vista detalhada do local de amostragem das plantas <i>E. andevalensis</i> e <i>C. ladanifer</i> | 45 |
| Figura 10. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) e (B) vista geral do ponto de amostragem 3..... | 45 |
| Figura 11. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) e (B) vista geral do local de amostragem 4. | 46 |
| Figura 12. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) e (B) vista geral do local de amostragem 5. | 46 |
| Figura 13. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Corte Gafo de Cima. (A) e (B) vista geral do local de amostragem 6. | 47 |
| Figura 14. Resultados dos ensaios de reprodução com <i>E. fetida</i> (média \pm desvio-padrão, n = 4). Barras marcadas com (*) representam valores significativamente diferentes do grupo controlo em solo artificial (0%) (Teste de Dunnett)..... | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Resultados dos ensaios de germinação com <i>L. sativa</i> (média \pm desvio-padrão, n = 4)..... | 76 |
| Figura 16. Bioacumulação de As pela <i>E. fetida</i> depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média \pm desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$). | 78 |
| Figura 17. Bioacumulação de Cu pela <i>E. fetida</i> depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média \pm desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$). | 78 |
| Figura 18. Bioacumulação de Pb pela <i>E. fetida</i> depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média \pm desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$). | 79 |
| Figura 19. Bioacumulação de Zn pela <i>E. fetida</i> depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média \pm desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$). | 79 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Valores de referência para alguns metais existentes nas normas Canadenses (<i>Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health</i> informação actualizada em Novembro de 2006, acedida em: http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html?category_id=124 , a 20/07/2011). | 22 |
| Tabela 2. Classificação dos solos quanto à reação, ou seja pH(H ₂ O). | 49 |
| Tabela 3. Classificação dos solos quanto ao teor em matéria orgânica..... | 51 |
| Tabela 4. Análise granulométrica dos solos. | 64 |
| Tabela 5. Principais características físico-químicas dos solos amostrados (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma linha seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$)..... | 67 |
| Tabela 6. Resultados obtidos para o As nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$)..... | 69 |
| Tabela 7. Resultados obtidos para o Cu nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$)..... | 70 |
| Tabela 8. Resultados obtidos para o Pb nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$)..... | 71 |
| Tabela 9. Resultados obtidos para o Zn nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$)..... | 72 |
| Tabela 10. Resultados obtidos para os parâmetros ecotoxicológicos no ensaio de reprodução. | 75 |
| Tabela 11. Resultados obtidos para os parâmetros ecotoxicológicos no ensaio de germinação. | 76 |
| Tabela 12. Coeficientes de correlação de Pearson calculados para os teores em As, Cu, Pb e Zn bioacumulados pela <i>E. fetida</i> durante os 28 dias de exposição aos solos, e os repetivos teores no solo nas diferentes frações (n = 18, $P < 0,05$)..... | 80 |
| Tabela 13. Resultados obtidos para as atividades enzimáticas dos solos (média ± desvio-padrão, n=3)..... | 83 |
| Tabela 14. Resultados obtidos para o teor em As, Cu, Pb e Zn em amostras de <i>C. ladanifer</i> recolhidas nos diferentes locais de amostragem (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na | |

mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).....86

Tabela 15. Resultados obtidos para o teor em As, Cu, Pb e Zn em amostras de *E. andevalensis* recolhidas nos diferentes locais de amostragem (média \pm desvio-padrão, $n = 3$).

Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).....87

Tabela 16. Coeficientes de correlação de Pearson calculados para os teores em As, Cu e Zn nas folhas de *E. andevalensis* e *C. ladanifer*, e os repetivos teores no solo nas diferentes frações ($n = 18$). As correlações marcadas são significativas com os seguintes níveis de significância: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

.....88

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

| | |
|------------------|--|
| CE | Condutividade elétrica |
| COV | Cadeia orogénica varisca |
| CTC | Capacidade de troca catiónica |
| CVS | Complexo vulcânico sedimentar |
| EC ₅₀ | Concentração que promove 50% de redução na característica em análise (<i>e.g.</i> sobrevivência, reprodução, acumulação de biomassa) |
| EDM | Empresa de Desenvolvimento Mineiro |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| <i>e.g.</i> | Abreviatura do latim <i>exempli gratia</i> , significa “por exemplo” |
| EPA | Agência de Protecção Ambiental dos EUA (do Inglês <i>Environmental Protection Agency</i>) |
| ESAB | Escola Superior Agrária de Beja |
| EXMIN | Companhia de Indústria e Serviços Mineiros |
| FPI | Faixa Piritosa Ibérica |
| IGM | Instituto Geológico e Mineiro |
| INETI | Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação |
| ISO | Organização Internacional de Normalização (do Inglês <i>International Organisation for Standardisation</i>) |
| LOEC | Concentração mínima para a qual já se observa um efeito tóxico significativo (do inglês <i>Lowest observable effect concentration</i>) |
| MO | Matéria orgânica |
| NOEC | Concentração máxima para a qual ainda não se observa um efeito tóxico significativo (do inglês <i>No observable effect concentration</i>) |
| OECD | Organização Europeia de Cooperação e Desenvolvimento Económico |
| TPF | Trifenilformazon |
| TTC | 2, 3, 5 – Trifeniltetrazolium |
| ZSP | Zona Sul Portuguesa |

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Considerações iniciais

A procura do minério, e da sua eventual utilização, remonta aos primórdios da existência humana, tendo desempenhado, desde essa altura, um papel essencial na sua sobrevivência e no seu progresso (Gonçalves, 2010). Em Portugal, a exploração mineira possui uma tradição milenar, não tendo, as explorações mais antigas, sido planeadas de modo a minimizar os impactes ambientais decorrentes do seu funcionamento (Oliveira, 1997). Por outro lado, o encerramento e abandono das explorações mineiras geram problemas ambientais ainda maiores, especialmente quando não são tomadas medidas de isolamento das escórias e impermeabilização dos seus locais de deposição (Bääh, 1989), deixando vastas áreas abandonadas e completamente desertas de vegetação, onde os agentes erosivos contribuem para um agravamento gradual do problema e para um alargamento da zona afetada.

A contaminação por metais em solos de regiões envolventes de minas abandonadas é amplamente reconhecida como um risco ecológico e a avaliação dos seus impactes ambientais de enorme importância. Independentemente da técnica de obtenção ou da sua utilização, os metais, a médio ou a longo prazo, acabam por ser disseminados no ambiente, sendo frequentemente causa de *stress* nos ecossistemas naturais e humanizados, *stress* esse agravado pela concomitante acidificação do solo, tornando-se também muito perigosa para a saúde humana e animal, pois os metais pesados acumulam-se nos organismos vivos, e podem provocar cancro, morte por envenenamento, perda de biodiversidade, assim como contaminação de água superficial e subterrânea. Atualmente, as companhias mineiras são obrigadas a cumprir normas ambientais, de encerramento e de funcionamento, bastante estritas, de forma a assegurar que a área afetada pela exploração mineira regressa à sua condição inicial, ou próxima da inicial e, em alguns casos, até melhor que a inicial.

O solo constitui um sistema dinâmico, no qual existe um equilíbrio muito delicado entre o teor em metal total ou pseudo-total (fração inativa ou inerte), a fração móvel (efetivamente solúvel, muito ativa, biodisponível) e a fração mobilizável (potencialmente biodisponível, lixiviável e parcialmente ativa) (Alvarenga, 2009; Gupta *et al.*, 1996). Por isso, embora a análise do teor em metais totais de um determinado solo constitua uma componente importante na avaliação da qualidade desse solo, fornece muitas vezes informação inadequada ou insuficiente no que diz respeito à biodisponibilidade, à mobilidade e à toxicidade que esses metais apresentam no solo em questão (Alvarenga, 2009).

Pelo exposto, existe atualmente alguma polémica acerca dos valores de referência existentes nas normas oficiais de alguns países, baseadas em teores totais, as quais, na maioria dos casos, sobrestimam os riscos. De facto, estudos em laboratório e em campo demonstraram que os efeitos biológicos não estão relacionados com a concentração total do contaminante no solo. Em vez disso, um organismo responde apenas à fração desse contaminante que está biologicamente disponível (biodisponível) (ISO/DIS 17402, 2006).

Deste modo, a análise química poderá ser, por si só, insuficiente na avaliação da toxicidade de solos devido a um conjunto de razões. Uma delas prende-se com o facto das concentrações analiticamente detetáveis de muitos compostos químicos não permitirem uma previsão rigorosa do seu efeito nefasto num organismo ou no ambiente, como um todo. Os métodos químicos permitem-nos quantificar o teor total de determinados contaminantes no solo, mas, para isso, é necessário saber que contaminantes se devem analisar. É difícil identificar, numa determinada área contaminada, qual ou quais os contaminantes que devem ser analisados, podendo, nalgumas situações de contaminação, a toxicidade estar a ser, erradamente, imputada a um determinado composto, simplesmente porque não se analisou outro (Alvarenga, 2009).

Para além disso, o teor total num determinado composto não permite tirar conclusões relativamente à sua toxicidade, uma vez que apenas a fração biodisponível desse composto poderá provocar *stress* e alterações fisiológicas nos organismos. Essa fração biodisponível do composto não pode ser inferida do teor total nesse composto, uma vez que aquela varia consideravelmente com a natureza química do composto, com as características do solo, com as condições ambientais, e com o organismo (*e.g.* uma mesma fração de um composto poderá não ser tóxica para um determinado organismo, e ser mais ou menos tóxica para outros organismos, ou seja, a biodisponibilidade varia conforme o organismo). Outra consideração importante prende-se com o facto dos compostos químicos não aparecerem isolados no ambiente, por isso, a possibilidade de interações positivas ou negativas entre os diferentes contaminante nas misturas, ou entre os contaminantes e os diferentes tipos de solos, terá que ser levada em consideração na avaliação da contaminação do solo como um todo (Alvarenga, 2009; Loureiro, 2004).

Por isso, a avaliação da qualidade de um solo deverá contemplar uma caracterização química clássica, que inclua parâmetros habitualmente utilizados na avaliação da sua fertilidade (*e.g.* teor em matéria orgânica, macronutrientes principais, N, P, K, e secundários, Ca e Mg), ou na avaliação do grau da sua contaminação (*e.g.* teor em metais pesados totais) mas deverá ser complementada com uma apreciação da sua qualidade que contemple métodos

químicos (de lixiviação, de extração química de passo único ou sequencial), métodos bioquímicos e métodos ecotoxicológicos, que permitam estimar a biodisponibilidade e a toxicidade dos diferentes contaminantes existentes no solo. Só com uma análise integrada destes resultados se poderá ter uma visão mais real acerca da biodisponibilidade dos poluentes nesse ambiente e dos possíveis efeitos tóxicos que esses poluentes estejam a exercer no ecossistema em questão (Alvarenga, 2009).

O estudo que aqui se desenvolve centra-se neste tipo de problemática: a potencial relação entre os vários métodos utilizados para estimar a biodisponibilidade dos contaminantes ao nível químico, com as respostas encontradas nos ensaios bioquímicos e ecotoxicológicos.

1.2. Objetivos

O trabalho desenvolvido nesta tese pretende, por isso, alcançar os seguintes objetivos:

Objetivo geral: efetuar o estudo de solos provenientes da zona mineira de São Domingos, tentando avaliar potenciais relações existentes entre os teores em metais totais, os teores em metais biodisponíveis, e a resposta ecotoxicológica dada por determinados organismos.

Objetivos específicos:

- Avaliar as propriedades físico-químicas do solo: textura, pH(H₂O), salinidade, matéria orgânica, azoto total, fósforo e potássio assimiláveis, e capacidade de troca catiónica;
- Avaliar os teores em metais (Cu, Pb e Zn) e metalóides (As) no solo, nas suas diferentes frações: teor total e teor biodisponível, utilizando diferentes métodos de extração de passo único;
- Avaliar a biodisponibilidade dos contaminantes existentes no local, considerando a sua toxicidade para os organismos, utilizando uma gama variada de recetores ecológicos e de níveis tróficos: microrganismos, plantas e macrofauna;
- Tentar avaliar se existe uma relação entre os vários métodos utilizados para estimar a biodisponibilidade dos contaminantes ao nível químico, com as respostas encontradas nos bioensaios.

1.3. Organização do estudo

O estudo contempla seis pontos de amostragem, cinco deles escolhidos na zona de influência das atividades mineiras que decorreram na Mina de São Domingos e um local não contaminado, que servirá de controlo. Foi efetuada uma caracterização das principais propriedades físico-químicas do solo nos diferentes pontos amostrados: textura, pH, salinidade, matéria orgânica, azoto total, P e K assimiláveis, capacidade de troca catiónica e foi também efetuada uma quantificação dos teores em metais e metalóides no solo (As, Cu, Pb e Zn) nas suas diferentes frações: teor total e teor biodisponível, utilizando diferentes métodos de extração de passo único. Foram testadas diferentes soluções extratantes, com vista a perceber qual a que permite uma avaliação da biodisponibilidade com uma melhor correlação com os resultados de toxicidade encontrados utilizando os bioensaios ou os ensaios de bioacumulação.

A biodisponibilidade dos contaminantes existentes no local foi avaliada considerando a sua toxicidade para os organismos, utilizando uma gama variada de recetores ecológicos e de níveis tróficos: microrganismos, plantas e macrofauna. Foi avaliada a atividade enzimática nos solos utilizando diferentes enzimas (desidrogenase, β -glucosidase, fosfatase ácida e urease). Foram efetuados ensaios de germinação utilizando *Lactuca sativa* L., ensaios de mortalidade e de reprodução com *Eisenia fetida*.

Os resultados obtidos foram avaliados na tentativa de encontrar uma potencial relação entre os vários métodos utilizados para estimar a biodisponibilidade dos contaminantes ao nível químico, com as respostas encontradas nos bioensaios.

2. CONTAMINAÇÃO EM ÁREAS MINEIRAS DO SETOR PORTUGUÊS DA FAIXA PIRITOSA IBÉRICA

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI) situa-se numa unidade principal da Cadeia Orogénica Varisca (COV) designada por Zona Sul Portuguesa (ZSP), localizada na parte SW da Península Ibérica (Fig. 1). A sua geometria forma um largo arco com cerca de 300 km de comprimento e 30 a 60 km de largura que se estende desde Sevilha até à região de Marateca-Águas de Moura (Barriga *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1998; Silva, 1998). Em ambos os extremos da FPI as rochas paleozóicas estão cobertas por sedimentos, constituindo o soco das bacias terciárias de Guadalquivir (Espanha) e Sado (Portugal). A presença de cerca de 90 jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos associados ao Complexo Vulcano Sedimentar (CVS), de idade Fameniano Sup.-Viseano Sup., confere-lhe um estatuto de província metalogénica de classe mundial (Matos e Martins, 2006).

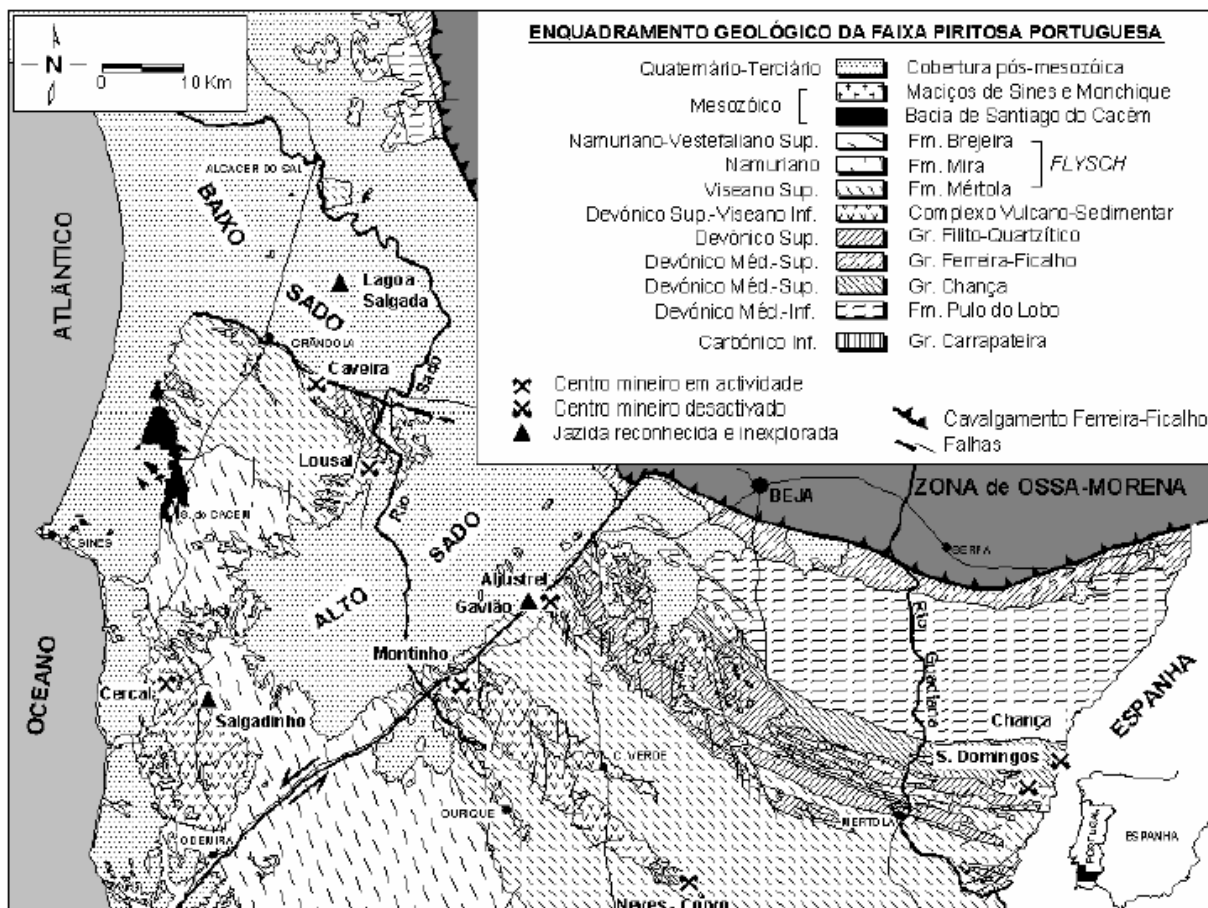


Figura 1. Jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos no sector português da Faixa Piritosa Ibérica (Matos e Oliveira, 2003).

A existência de numerosas ocorrências de minérios de cobre, ferro e manganês na FPI foi certamente determinante no modo de vivência das populações residentes, tendo existido

mineração desde o Calcolítico e durante a ocupação por tartéssios, fenícios e cartagineses (Oliveira e Matos, 2002). Na época romana foram intensamente explorados vários jazigos de sulfuretos da Faixa Piritosa como São Domingos, Aljustrel e Caveira, sobretudo na sua parte mais superficial, marcada pela existência de *chapéus de ferro* ou *gossans*. Os povos árabes pouco se dedicaram à atividade extrativa, antes preferindo negociar em entrepostos (caso de São Domingos) os concentrados de metais extraídos pelas populações autóctones (Oliveira e Oliveira, 1996; Matos *et al.*, 2002; Matos e Martins, 2003; 2006). No seguimento da revolução industrial do séc. XIX, reinicia-se a exploração de sulfuretos extraíndo-se, com técnicas modernas, grandes volumes de minério com vista à obtenção de cobre, pirite e enxofre. Em Portugal, a lavra operada em São Domingos, Aljustrel, Caveira e Chança estende-se posteriormente, durante o início do séc. XX, às Minas de Lousal e Montinho situadas no sector NW da FPI. Além das massas de pirite, ocorrem ainda na FPI depósitos estratiformes de ferro e manganês e mineralizações filonianas de cobre, antimónio, chumbo e bário. Enquanto estes jazigos foram explorados na sua maioria na segunda metade do séc. XIX, a extração de óxidos de ferro e manganês decorreu até à passada década de setenta.

O Serviço de Fomento Mineiro, organismo estatal precursor do Instituto Geológico e Mineiro (IGM), é criado em 1939 com o intuito de promover a atividade de prospeção no país e em particular na FPI (Queiroz *et al.*, 1989). A prospeção mineira na FPI teve maior desenvolvimento a partir dos anos 60, através da aplicação de novas técnicas geofísicas e geoquímicas e de cartografia geológica e estrutural de maior detalhe. As políticas de investimento em conhecimento geológico possibilitaram ao Estado o desempenho determinante quer na descoberta de novos depósitos (*e.g.* Lagoa Salgada, Neves Corvo, Salgadinho e Estação), quer no apoio e dinamização da atividade de prospeção de empresas privadas (Matos e Martins, 2003; 2004; 2006). O Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI) possui hoje um considerável volume de dados geológicos (mapas e sondagens), geofísicos (gravimetria, magnetometria, polarização induzida, sondagens elétricas verticais e sísmica) e geoquímicos (análises de minérios, sedimentos, solos e rochas) sobre a FPI, os quais possibilitam um bom conhecimento desta província metalogenética. Em Portugal, a prospeção de sulfuretos metálicos continua a desenvolver-se, fruto da forte probabilidade de virem a ser descobertos jazigos de metais básicos semelhantes ao de Neves Corvo e da existência do valioso banco de dados do INETI.

2.1. Contaminação e impacte ambiental das áreas mineiras no sector português da FPI

A maioria das minas diagnosticadas na FPI encontra-se numa situação de total abandono, testemunhando, com as suas ruínas, períodos não muito distantes em que a atividade extrativa de minérios metálicos se desenvolvia afincadamente (Matos e Martins, 2006). A quase totalidade das explorações mineiras abandonadas não possui estruturas adequadas que minimizem o seu impacte ambiental, como consequência direta da ausência de programas de manutenção após o processo de fecho. O vazio de responsabilidades que emerge, após o encerramento de cada mina, torna hoje difícil a aplicação do princípio do poluidor/pagador. À exceção da Mina de Neves Corvo, todas as explorações do sector português da FPI apresentam impactes ambientais significativos, sobretudo ao nível da rede hidrográfica. A Ribeira de São Domingos, afluente do Rio Chança e as Ribeiras do Roxo, de Corona e de Grândola, afluentes do Rio Sado constituem os cursos de água que se encontram mais afetados pela drenagem não controlada de efluentes ácidos provenientes, respetivamente, das áreas mineiras de São Domingos, Aljustrel, Lousal e Caveira (Matos e Martins, 2006).

Os troços da rede hidrográfica situados a jusante destes centros mineiros encontram-se afetados em vários quilómetros com águas de pH ácido (<4) e elevada condutividade. Os sedimentos recolhidos em São Domingos apresentam teores significativos em Pb, As, Sb, Cu, Zn, Fe e Ag (V, Cr). Na Ribeira da Água Forte, situada a NE de Aljustrel, foram analisados sedimentos com teores anómalos em Pb, Zn, Cu, As, Sb, Fe, P, Cr e V (Matos e Rosa, 2001).

Recentemente o INETI realizou a cartografia geológica e mineira destas áreas mineiras, em escala de grande detalhe (1/2500) o que possibilitou uma melhor compreensão da tipologia de escombros, do modo como se procedeu à atividade extrativa e do tipo de erosão que afeta as escombrelas e as infraestruturas mineiras (*e.g.* cortas, poços, campos de cementação e de lixiviação) (Matos, 2004; Matos e Martins, 2006). No *ranking* de perigosidade ambiental realizado pelo ex-IGM (Oliveira *et al.*, 2002; Matos e Martins, 2006) as minas da FPI surgem com um grau elevado devido ao grande volume de escombrelas existente, as quais contêm teores acentuados em metais e/ou metalóides, como Cu, Pb, Zn, As e Sb. As Minas de São Domingos, Aljustrel e Caveira destacam-se ainda pela presença de áreas significativas cobertas por escombros de rocha encaixante da mineralização, minério, escórias e materiais lixiviados, estimando-se que o seu volume seja de, respetivamente, >5 Mt, 5 Mt e >2 Mt. Na área de influência direta das explorações mineiras os solos encontram-se afetados, observando-se, porém, uma contaminação pouco dispersa, o que permite o desenvolvimento da floresta de eucalipto (São Domingos e Caveira) ou pinheiro (Lousal). As

áreas mineiras da FPI caracterizam-se ainda pela insegurança das suas cortas e poços, os quais se encontram geralmente desprotegidos. Em certos locais, observa-se também o mau uso das infraestruturas como depósito de lixo e de entulhos. As Minas de São Domingos, Aljustrel, Lousal e Caveira apresentam um bom potencial museológico em virtude do interesse didático do património mineiro e geológico que aí se pode observar (Matos *et al.*, 2002; Matos, 2005). A maioria das escombrelas apresenta uma boa estabilidade, fruto da sua reduzida altura, geralmente inferior a 3 m, do relevo aplanado e do elevado grau de abandono das áreas mineiras. No entanto, a utilização de escombros para pavimentação de caminhos e construção de aterros, por parte de privados e de serviços municipais, é responsável por situações de elevada instabilidade verificadas em escombrelas das Minas de São Domingos, Lousal, Caveira, Montinho, Ferragudo, Balança e Barrigão. Esta atividade favorece ainda a disseminação dos elementos contaminantes pela envolvente das explorações e o desgaste rápido e rutura dos corpos de escombros mais volumosos, com o conseqüente transporte de finos para a rede hidrográfica. Nas Minas de São Domingos, Lousal, Caveira, Balança e Barrigão foram também observados fenómenos preocupantes de erosão por abarrancamento e/ou deslizamento, muitas vezes facilitados pela ausência de cobertura vegetal. A segurança mineira de cada exploração, é variável de caso para caso, depende essencialmente do bom senso do(s) proprietário(s) do terreno que, preocupados em proteger pessoas e animais, vedam segundo critérios pessoais e de forma aleatória os poços e cortas abandonados (Matos e Martins, 2006).

2.2. Enquadramento legal e institucional

Após várias décadas de atividade mineira em Portugal, constata-se que o exercício desta atividade gerou um passivo ambiental muito significativo, agravado, ainda, pelos riscos potenciais que a falta de um adequado processo de recuperação ambiental das áreas abrangidas pode trazer para as populações e para os ecossistemas envolventes (http://bdjur.almedina.net/citem.php?field=node_id&value=1191552: Biblioteca Digital, acedido em 04/09/2011). O reconhecimento da gravidade da situação e da urgência em encontrar meios adequados de reposição do equilíbrio ambiental de áreas sujeitas à atividade mineira, designadamente aquelas que hoje se encontram em estado de degradação e abandono, constitui um importante fundamento do ponto de vista legal (http://bdjur.almedina.net/citem.php?field=node_id&value=1191552: Biblioteca Digital, acedido em 04/09/2011). Nestes termos, e tendo presente que constitui um dever fundamental

da Constituição, da Lei de Bases do Ambiente e dos Planos Municipais de Ordenamento do Território a proteção das áreas degradadas do território nacional:

- A Constituição da República estabelece como tarefas do estado “defender a natureza, o ambiente e os recursos naturais e assegurar um correto ordenamento do território”, assim como “promover o uso racional dos recursos naturais” (<http://www.parlamento.pt/Legislacao/Paginas/ConstituicaoRepublicaPortuguesa.asp>: Constituição da República Portuguesa, acedido em 04/09/2011).
- A lei de Bases do Ambiente prevê que constitui um dever fundamental do Estado a recuperação das áreas degradadas do território nacional, bem como “adoção de medidas preventivas da degradação do ambiente resultante dos trabalhos de extração de matéria-prima que possam pôr em perigo a estabilidade dos sistemas naturais e sociais e recuperação obrigatória da paisagem quando da exploração do subsolo resulta alteração quer da topografia preexistente, quer de sistemas naturais notáveis ou importantes, com vista à integração harmoniosa da área sujeita à exploração na paisagem envolvente” (Lei nº 11/87, de 7 de Abril).
- A legislação sobre regime jurídico da concessão do exercício da atividade de recuperação ambiental das áreas mineiras degradadas vigente no Decreto-Lei nº 198-A/2001 estabelece que “a recuperação das áreas mineiras degradadas visa a valorização ambiental, cultural e económica, garantindo a defesa do interesse público e a preservação do património ambiental” (Decreto-Lei nº 198-A/2001 de 6 de Julho).

2.3. Programas de recuperação ambiental

Enquanto, no passado, a exploração mineira se norteava, quase exclusivamente, pelo princípio do melhor aproveitamento das jazidas, acompanhada, principalmente, por critérios económicos e de alguma segurança, mais recentemente começou a ser observado pelos operadores, com maior insistência, um outro princípio baseado numa exploração capaz de garantir a proteção ambiental das áreas envolventes, suscetíveis de virem a ser agredidas. Procura-se, assim, enquadrar a indústria extrativa nos conceitos e parâmetros do denominado desenvolvimento sustentável, pelos quais se garanta que a extração mineira não possa prejudicar o uso subsequente da terra, nem o ordenamento das regiões (Crawford, 1995).

A empresa pública EXMIN – Companhia de Indústria e Serviços Mineiros S.A., cujo capital social é detido na totalidade pela EDM – Empresa de Desenvolvimento Mineiro, é

detentora dos direitos de concessão do programa de recuperação das áreas mineiras portuguesas desde 2001 (Decreto-Lei nº 198-A/2001, de 6 de Julho), em particular do passivo ambiental referente à atividade extrativa da atual Lei de Minas, publicada em 1990 (Decreto-Lei nº 90/90). A EXMIN executou estudos de caracterização e de reabilitação ambiental das áreas mineiras, encontrando-se já concluído o projeto de reabilitação da Mina de Aljustrel e, em fase de estudo, os casos de São Domingos, Lousal e Caveira (Matos e Martins, 2006).

Os modelos de intervenção propostos pela empresa privilegiam a concentração de escombros condicionada às características de cada espaço mineiro, o isolamento superficial das escombrelas principais através de valas perimetrais e da sua cobertura com terra vegetal, o controle de efluentes ácidos através da construção de bacias de evaporação e de pantanais de Ribeira (*wetlands*) e o fecho de galerias e poços (EXMIN, 2003; Martins, 2005; Matos e Martins, 2006). Porém, a remediação do impacto ambiental das minas de pirite é largamente condicionada pela acentuada complexidade das estruturas geológicas e mineralizadas aí existentes e pelo tipo de extração realizada. A contaminação de aquíferos é facilitada pela presença de falhas e pela extensão dos trabalhos subterrâneos, desenvolvidos muitas vezes desde a época romana. Por outro lado, observa-se um impacto de origem natural (litológica) associada ao processo de alteração meteórica dos chapéus de ferro dos jazigos (Matos e Martins, 2006).

Em 2005, o Ministério das Atividades Económicas e do Trabalho deu orientações para que fosse efetuada uma reestruturação da EDM, que consistiu na integração da EXMIN na EDM. Com esta integração, consumada em Setembro de 2005, a EDM passou a ser responsável pelo conjunto de intervenções de reabilitação de antigas áreas mineiras, até então a cargo da EXMIN (Alvarenga, 2009).

3. PROPRIEDADES DOS SOLOS EM ZONAS MINEIRAS

Após o encerramento da mina, o impacto negativo continua a verificar-se, especialmente quando não são tomadas medidas de isolamento das escórias e impermeabilização dos seus locais de deposição. Os solos ostentam inúmeras limitações específicas destes locais, como sejam a produção de efluentes ácidos com elevadas concentrações em metais, os quais têm origem na oxidação de sulfuretos e possuem características muito próprias que os tornam muito reativos, como valores de pH muito baixos e elevadas concentrações em metais ou semi-metais normalmente tóxicos, a formação dos chamados “efluentes mineiros de drenagem ácida”, fruto da lixiviação não controlada de extensas áreas cobertas por escombreciras de minério e estruturas utilizadas na extração dos metais, a baixa disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento vegetativo, a capacidade de retenção de água do solo e os declives instáveis, provocados pelo acidentado do terreno e elevada acidez (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009) que tem origem na drenagem ácida formada a partir dos diversos tipos de resíduos da atividade mineira que foram sendo depositados na área envolvente (Johnson, 2003; Alvarenga, 2009).

Estes resíduos, expostos ao ar e à água, sofrem oxidação originando a libertação de hidrogeniões, com conseqüente aumento de acidez e do teor em sais solúveis. O resultado final são escombreciras ou solos de minas que são demasiado ácidos para suportar crescimento vegetativo e escoamento de lixivados que contém elevadas concentrações em sais solúveis (Sutton e Dick, 1987; Pichtel *et al.*, 1994; Johnson, 2003; Alvarenga, 2009). Apesar da acidez e do teor em sais solúveis diminuir ao longo do tempo, devido à progressiva atuação dos agentes erosivos, o solo e, principalmente, as escombreciras, poderão continuar demasiado ácidos para o crescimento vegetativo (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009).

3.1. Propriedades físicas

Na atividade mineira são produzidos dois tipos principais de resíduos, os fragmentos grosseiros de rocha não mineralizada e os escombros, estes apresentam características físicas muito distintas (Alvarenga, 2009).

- **Fragmentos grosseiros de rocha não mineralizada** (habitualmente com diâmetro entre 2-20 cm) - têm origem nas escavações que são necessárias até deixar a descoberto a rocha

mineralizada, ou em fragmentos de rocha com mineralização que os torna impróprios para processamento (Alvarenga, 2009);

- **Escombros** - constitui o resíduo propriamente dito, o qual tem origem no processamento do minério (Williamson e Johnson, 1981; Tordoff *et al.*, 2000; Alvarenga, 2009). O escombros é constituído por material de granulometria inferior (<2 mm), que cai normalmente nas categorias da areia ou do limo. Os valores de granulometria estão limitados e a ausência dos principais agentes que promovem a agregação entre as partículas no solo, nomeadamente a argila e a matéria orgânica, tornam este material desestruturado, instável e altamente sujeito a processos erosivos (Williamson e Johnson, 1981; Alvarenga, 2009). O progressivo desgaste destes escombros, que se encontram depositados um pouco por todo o lado nas minas abandonadas, leva à disseminação das partículas com as características referidas nos solos em redor. O crescimento de plantas sobre este tipo de solos ou escombros é muito limitado, uma vez que a quantidade de água que têm à sua disposição é muito reduzida, consequência da deficiente infiltrabilidade e capacidade de retenção de água. Escombros com material muito pedregoso ou grosseiro, severamente compactado, poderão ter apenas água disponível de 2,3 a 14,7% (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009).

As principais limitações, em termos físicos, dos solos afetados por atividades mineiras são:

- **Compactação** - afeta o estabelecimento e o desenvolvimento das plantas, uma vez que aumenta a resistência oferecida à penetração das raízes e à emergência das plantas e, reduzindo o tamanho dos poros, diminui a infiltrabilidade e a sua capacidade de retenção de água (Williamson e Johnson, 1981; Sutton e Dick, 1987; Chan *et al.*, 2003; Wong, 2003; Alvarenga, 2009). A formação desta camada superficial, impermeável à água, provoca a formação de crosta e o encharcamento, gerando um escoamento superficial acentuado que contribui, em muito, para os processos erosivos destes solos (Pichtel *et al.*, 1994; Alvarenga, 2009). O grau de compactação destes solos, ou escombros, pode ser revelado pela sua densidade aparente que, num estudo referido por Sutton e Dick (1987) apresentou valores médios de 1,47 Mg m⁻³, que contrastam com os 1,03 Mg m⁻³ de solos não perturbados. As operações de nivelamento dos escombros, e a circulação de maquinaria sobre eles poderão compactar o solo até profundidades de 45-60 cm (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009);
- **Declive** - baixo teor em água no solo, e ausência de sombras proporcionadas pela vegetação, influenciam negativamente uma outra propriedade nestes solos: a sua temperatura. As temperaturas altas que se podem atingir nestas circunstâncias, principalmente na extração

de carvão ou minérios de cor mais escura, podem levar à morte das plantas em emergência. Quando a temperatura do ar atinge valores entre 30-35°C, a camada superficial destes escombros pode atingir valores entre 50-55°C, nos materiais mais claros, e entre 65-70°C nos materiais de cor mais escura (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009).

3.2. Propriedades químicas

As principais limitações químicas dos solos afetados por atividades mineiras são:

- **Acidez** - esta é gerada, no processo de decomposição da pirite na presença de oxigênio e de água, o qual é bem conhecido, e explica também as concentrações elevadas de anião sulfato nos solos degradados por atividades mineiras, e nos efluentes mineiros de drenagem ácida (Williamson e Johnson, 1981; Salomons e Förstner, 1984; Sutton e Dick, 1987; Sengupta, 1993; Evangelou e Zhang, 1995; Bellaloui *et al.*, 1999; Johnson, 2003; Alvarenga, 2009).
- **Salinidade** - a oxidação do escombros provoca a libertação de elevadas concentrações de sais solúveis, principalmente cátions e o anião sulfato (Sutton e Dick, 1987; Tordoff *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2002; Alvarenga, 2009). Estas elevadas concentrações salinas podem afetar o metabolismo e/ou a permeabilidade das membranas nas plantas. Ye *et al.* (2002) referem que, para valores de condutividade elétrica de 4 dS m⁻¹, se verifica a inibição de crescimento e da germinação, o que afeta a produtividade da maioria das culturas. Williamson e Johnson (1981) referem que, para valores de condutividade elétrica superiores a 16 dS m⁻¹, não se verifica qualquer tipo de crescimento de plantas.
- **Matéria orgânica** - os solos afetados por atividades mineiras apresentam, normalmente, teores muito baixos de matéria orgânica sendo, conseqüentemente, deficientes nos nutrientes essenciais para as plantas, como sejam N, P, K, Ca e Mg (Sutton e Dick, 1987; Pichtel *et al.*, 1994; Tordoff *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Wong, 2003; Alvarenga, 2009). O deficiente teor em matéria orgânica e em minerais de argila fazem com que estes solos possuam capacidades de troca catiónica baixas, o que os impede de armazenar alguns nutrientes essenciais (Williamson e Johnson, 1981; Alvarenga, 2009).
- **Metais e/ou metalóides** - elevadas concentrações em metais e/ou metalóides que diferem de local para local em função do tipo de minério que aí era explorado, bem como dentro do próprio coto mineiro (Pichtel *et al.*, 1994; Tordoff *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2002; Johnson, 2003; Alvarenga, 2009). Estes teores podem variar entre 0,1-0,5% (p/p), nalgumas

escombrelras mais modernas, até valores superiores a 5% (p/p), em escombrelras de antigas minas abandonadas, quando o processamento do minério era menos eficiente do que na atualidade (Williamson e Johnson, 1981; Tordoff *et al.*, 2000; Alvarenga, 2009).

3.3. Propriedades biológicas

Os solos afetados por atividades mineiras, exibindo, na maioria dos casos, uma acidez elevada, possuem uma atividade biológica reduzida, que persiste durante largos anos, mesmo após a cessação da atividade no local (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009). Esta atividade biológica é essencial para que haja decomposição dos detritos de natureza orgânica no solo, a qual liberta os nutrientes vegetais que são assim reciclados no ambiente, e para a melhoria das propriedades físicas do solo.

Sutton e Dick (1987) referem estudos de vários autores, os quais testemunham essa reduzida atividade biológica. Também a atividade e o crescimento microbiano diminuem em consequência da atividade mineira, e permanecem baixos em escombros ácidos que não suportam vegetação, com exceção de alguns microrganismos acidófilos (Sutton e Dick, 1987; Johnson, 2003; Alvarenga, 2009). De todos estes microrganismos acidófilos, que oxidam os minerais de pirite, o mais conhecido é a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (antes conhecida por *Thiobacillus ferrooxidans*), que foi a primeira bactéria com essa capacidade a ser descoberta (Johnson, 2003; Alvarenga, 2009). O mesmo autor faz referência a outras bactérias acidófilas com capacidade para colonizar escombros de pirite (Johnson, 2003; Alvarenga, 2009). Porém, relativamente a outros microrganismos, os escombros mineiros apresentam um número inferior de bactérias, actinomicetes e fungos do que os solos não perturbados ou do que os escombros revegetados (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009).

Outros indicadores de perturbação biológica são a taxa respirométrica e a atividade enzimática, as quais também são menores em solos afetados por atividades mineiras. Este facto pode ser atribuído ao elevado teor em metais solúveis, que ocorrem a valores de pH baixos ou, segundo outros autores, ao teor insuficiente de azoto no solo (Sutton e Dick, 1987; Alvarenga, 2009).

3.4. Comportamento dos metais no solo

O solo é uma mistura heterogénea de partículas minerais e de material orgânico, de constituição e complexidade muito diversa, que se encontram agregados de forma mais ou

menos intrínseca e constituem a chamada fase sólida do solo. Os poros existentes entre estes agregados (e dentro deles) são ocupados quer por ar, quer por água (Brady, 1990).

A fração mineral sólida do solo pode incluir, em proporções extremamente variáveis, fragmentos de rocha, minerais primários, minerais secundários, óxidos e sais não combinados. Os minerais primários possuem a mesma constituição da rocha mãe do solo, encontrando-se expostos a uma progressiva alteração, provocada por diversos fenómenos físico-químicos e biológicos, dando origem aos minerais secundários (minerais de argila, óxidos de Fe, Al e Mn e, por vezes, carbonatos). Os minerais secundários, resultantes da alteração dos primários, são fragmentos ou partículas de formas e dimensões extraordinariamente variáveis, desde pedras e cascalho até materiais tão finos que apresentam propriedades coloidais (Alvarenga, 2010).

A matéria orgânica do solo é constituída por resíduos de plantas e de animais mortos parcialmente desintegrados e por outros compostos orgânicos sintetizados pelos microrganismos decompositores presente no solo. Este material orgânico está continuamente a ser decomposto e resintetizado. Assim, a matéria orgânica é constituída quer por compostos simples, que a curto ou a médio prazo são mineralizados, quer por compostos bastantes complexos (o chamado húmus) e resistentes à degradação durante muitos anos (Brady, 1990). Estes componentes sólidos coloidais, minerais e orgânicos, encontram-se associados na forma de agregados que são estabilizados por catiões (complexo argilo-húmico), criando um sistema de poros de tamanho variado, que se encontram cheios de ar ou de água (Alloway, 1995; Alvarenga, 2009). Este meio não seria o que é se não fosse habitado por uma variedade enorme de macro e microrganismos e pelas raízes das plantas, responsáveis por uma serie de reações importantíssimas para a formação e vida do solo e, em última análise, para a vida na Terra.

O termo metal pesado é muito impreciso e pode levantar grandes objeções. É originalmente um termo baseado na densidade do elemento, o que possui um significado a nível biológico pouco significativo. Aplica-se geralmente ao grupo de metais com uma densidade atómica superior a 5 g/cm^3 , ou seja, 5 vezes superior à da água. Hoje em dia utiliza-se, embora de forma não consensual, para designar metais com número atómico > 20 . Embora não seja um termo muito preciso, é muito facilmente reconhecido e associado a elementos como o Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Zn e Pb, por exemplo, elementos esses normalmente associados a problemas de poluição e toxicidade (Alvarenga, 2007).

No grupo dos metais pesados encontram-se alguns micronutrientes, como é o caso do Mn, Zn e Cu. Alguns metais pesados desencadeiam toxicidade preferencialmente nas plantas, podendo afirmar-se que são fitotóxicos. É o caso, por exemplo, do Cu, Ni e Zn. Outros

metais, como o Cd e o Hg, são mais zootóxicos e são, geralmente, fonte de maior preocupação para o Homem (Alvarenga, 2007).

Os metais no ambiente do solo existem como componentes de diferentes frações (Alloway, 1995; Salt *et al.*, 1995; Alvarenga, 2009):

- iões metálicos livres, ou complexos solúveis desses iões na solução do solo;
- iões metálicos a ocupar locais de permuta iónica e especificamente adsorvidos em constituintes inorgânicos do solo;
- metais ligados a compostos orgânicos;
- na forma de compostos precipitados ou insolúveis, nomeadamente óxidos, carbonatos e hidróxidos;
- metais na estrutura cristalina de minerais.

3.4.1. Fatores que influenciam a biodisponibilidade do metal

A fração à qual está associado um metal é muito importante na determinação da sua mobilidade e disponibilidade no solo, sendo influenciada por fatores como sejam (Alloway, 1995; Hursthouse, 2001; Adriano *et al.*, 2004; Tabak *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009):

- o pH;
- o teor em matéria orgânica e a sua composição;
- os minerais de argila;
- a presença e a natureza de óxidos e hidróxidos de Fe/Mn/Al;
- o potencial redox;
- a concentração de sais e de agentes complexantes;
- o teor em catiões e aniões da solução do solo.

Essa influência é exercida ao nível das constantes de equilíbrio das diferentes reações que transferem os metais de uma fase para outra: precipitação e dissolução, complexação e descomplexação, adsorção e dessorção (Domingues, 1999; Alvarenga, 2009).

3.4.2. Processos que influenciam a mobilidade e biodisponibilidade dos metais no solo

Os fatores descritos anteriormente podem influenciar a mobilidade e biodisponibilidade dos metais no solo ao nível das constantes de equilíbrio das diferentes reações que transferem os metais de uma fase para a outra. Essas reações são: precipitação e dissolução, complexação e descomplexação, adsorção e dessorção.

Na Figura 2. encontram-se esquematizadas as reações que transferem os metais entre as diferentes formas no solo.

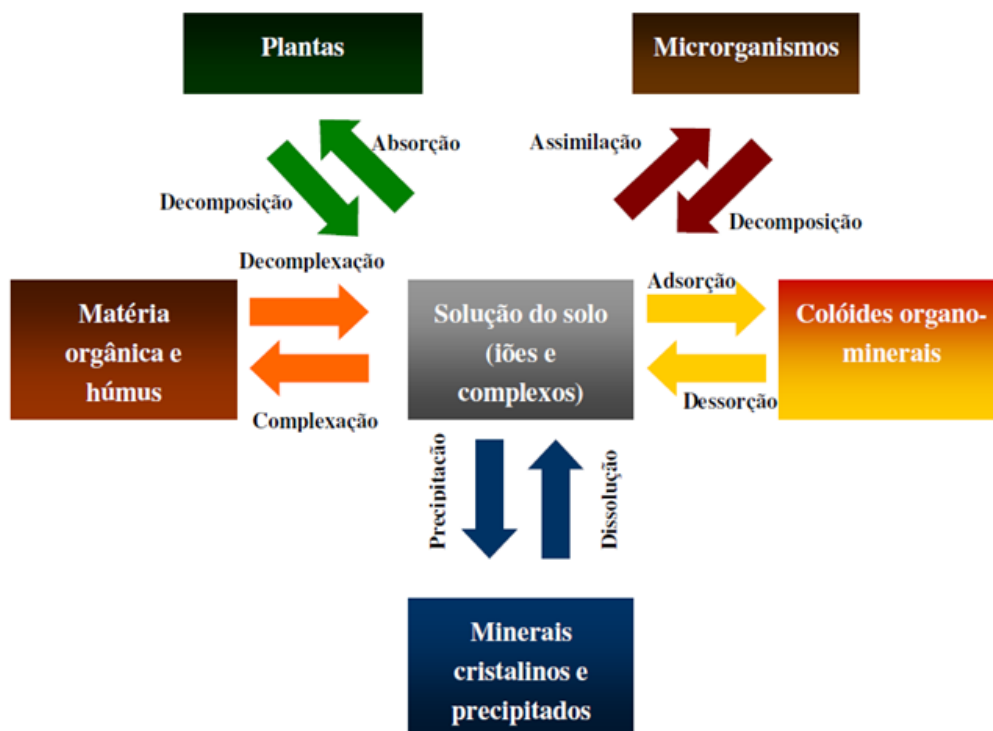


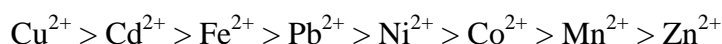
Figura 2. Equilíbrio dinâmico dos metais no solo (adaptado de Alloway (1995) e de Domingues (1999)).

Como se pode verificar, os processos físico-químicos que influenciam a mobilidade e biodisponibilidade dos metais no solo são a adsorção, a complexação e as reações de precipitação.

As reações de **precipitação** ocorrem quando a solução se apresenta sobressaturada relativamente à fase sólida, sendo as concentrações de equilíbrio reguladas pelas constantes de solubilidade dos respetivos sais (Adriano *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009).

Existe um grande número de ligandos no solo, orgânicos ou inorgânicos, com os quais os metais se podem ligar formando um complexo - reações de **complexação**. Os compostos orgânicos existentes no solo possuem uma afinidade muito elevada para catiões metálicos,

devido à presença de ligandos ou grupos que formam quelatos com o metal. Com o aumento do pH, os grupos funcionais carboxílicos, fenólicos, alcoólicos e carbonílicos da matéria orgânica dissociam-se (perdem o próton e adquirem por isso carga negativa), aumentando, assim, a sua afinidade como ligandos para os cátions metálicos. A ordem geral de afinidade dos cátions metálicos por ligandos orgânicos é a seguinte (Adriano *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009):



A **adsorção** refere-se a um íão associado a uma superfície sólida (orgânica ou mineral), quer por interação química por partilha de eletrões (ligação covalente), quer por atração electrostática (ligação iónica), a qual envolve um íão e uma superfície com carga oposta. Utiliza-se a designação de *atração não-específica* quando a carga dos íões neutraliza a carga das partículas do solo através de atração electrostática (permuta catiónica), enquanto a *adsorção específica* envolve a formação de ligação química, por partilha de eletrões, entre os íões e os locais de permuta na superfície das partículas do solo (Adriano *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009).

Considerando a informação anterior, podemos analisar as transferências de metais que se verificam entre as diferentes fases do solo (Fig. 2): quando um elemento excede a concentração de equilíbrio na solução do solo pode precipitar e, se a concentração desse elemento na solução do solo for inferior ao equilíbrio de solubilidade da fase sólida, pode dissolver-se (precipitação/dissolução). Quando as plantas absorvem metais da solução do solo a sua concentração junto às raízes diminui e, por sua vez, os metais adsorvidos nos locais de permuta iónica sofrem um processo de dessorção, indo substituir os que foram deslocados da solução do solo. A remoção dos metais da solução do solo também induz a sua dissolução a partir dos compostos precipitados, com reposição dos íões na solução do solo e nos locais de permuta iónica (adsorção). Os microrganismos também removem metais da solução do solo, os quais, por decomposição da matéria orgânica, são de novo repostos na solução do solo. As atividades enzimáticas e metabólicas podem, portanto, exercer um efeito importante nos equilíbrios de transferência dos metais entre as diferentes formas no solo (Domingues, 1999; Adriano *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009).

Tanto as propriedades do solo, como a composição da solução do solo, são decisivas na definição do equilíbrio dos metais entre a solução do solo e a fase sólida. A concentração de metais em solução é muito influenciada pelo pH e pela natureza dos aniões orgânicos e

inorgânicos existentes no solo. O efeito que o aumento do pH do solo, a valores de $\text{pH} > 6$, provoca no abaixamento da atividade de íons livres em solução está intimamente relacionado com o aumento das cargas superficiais nos óxidos de Fe, Al e Mn, complexação pela matéria orgânica, ou precipitação (Adriano *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009).

É referido, por diversos autores, o facto da associação de metais à fração sólida em solos e sedimentos ser tipicamente dominada por processos de adsorção (Alloway, 1995; Domingues, 1999; Tabak *et al.*, 2004), constituindo este o processo químico que mais influência exerce sobre o comportamento e a biodisponibilidade dos metais nos solos. Porém, dependendo das propriedades do contaminante e da especificidade do local, a precipitação poderá desempenhar um papel predominante no controle da concentração dos metais em solução (Tabak *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009).

3.4.3. Toxicidade e tolerância aos metais nas plantas

Um ambiente poluído não significa necessariamente ausência de crescimento de algum tipo de vegetação. A composição elementar das plantas é, no entanto, muito diferente da dos solos em que estas crescem, podendo apresentar ou não alguma relação com ela. Muitas destas diferenças podem ser atribuídas à capacidade que as plantas têm de absorver, de forma diferencial, macro e micronutrientes essenciais a partir do solo, entre os quais metais pesados (Alvarenga *et al.*, 1998). De acordo com Baker (1983), citado por Alvarenga *et al.* (1998) as plantas são como “mineiras de [nutrientes] da crosta terrestre”, o que é uma expressão muito elucidativa do facto das plantas serem muito seletivas para os nutrientes que assimilam.

3.4.3.1. Toxicidade

Os metais são importantes para a vida saudável da planta, mas o excesso ou a deficiência destes têm efeitos profundos no crescimento e morfologia da mesma. Concentrações excessivas de alguns metais nos solos, que produzem sintomas tóxicos, podem surgir devido a uma variedade de causas (Alvarenga *et al.*, 1998).

A toxicidade é muitas vezes simplesmente definida como um efeito nocivo num organismo, podendo ser aguda (dose elevada num tempo de exposição curto, normalmente letal), ou crónica (dose pequena durante um longo período de exposição, que pode ser letal ou sub-letal). A toxicidade dos metais nas plantas resulta frequentemente em alterações na

morfologia dos frutos, folhas ou raízes, que se demonstram de várias formas (Alvarenga *et al.*, 1998).

A nível celular podem identificar-se vários mecanismos possíveis através dos quais o metal pode causar danos na planta: (1) bloqueio de grupos funcionais de moléculas biologicamente importantes, como sejam enzimas, polinucleótidos, ou sistemas de transporte de iões de nutrientes; (2) desalojamento e/ou substituição de iões metálicos essenciais de biomoléculas e unidades funcionais celulares; (3) modificando a conformação ativa de biomoléculas, especialmente de enzimas e ácidos nucleicos; e (4) rompimento da membrana de células ou de organelos celulares, com perda da sua integridade (Alvarenga *et al.*, 1998).

No entanto, é preciso ter presente que “o quanto de efeito tóxico” (ou “que combinação de efeitos tóxicos”) é necessário para produzir danos visíveis e sintomas de toxicidade variam de planta para planta, em combinação com o tipo de solo, condições ambientais e ecótipo (Alvarenga *et al.*, 1998).

3.4.3.2. Tolerância

Como alguns metais possuem propriedades muito próximas de outros que lhe são essências, a planta pode tornar-se tolerante para aqueles que não são essenciais. Tem sido propostos vários mecanismos de tolerância para explicar como é que algumas plantas competem com o sucesso em condições ambientais tóxicas, sendo capazes de desenvolver ecótipos tolerantes. Os mecanismos de tolerância podem ser divididos em cinco tipos principais (Alvarenga *et al.*, 1998):

- (1) Exsudação de ligandos orgânicos pela raiz: as moléculas orgânicas exsudadas pelas células da raiz podem formar quelatos com os metais existentes na rizosfera, tornando-os indisponíveis, ou menos disponíveis, para a absorção pela raiz;
- (2) O metal está disponível para a raiz mas não é captado: dá-se por exemplo uma alteração da parede celular que resulta numa diminuição da permeabilidade ao ião metálico tóxico;
- (3) O metal é captado mas é tornado “inofensivo” dentro da planta: dá-se, por exemplo, a sua deposição na parede celular ou nos vacúolos;
- (4) O metal entra mas é seguidamente excretado: por exemplo, através do fenómeno da exsudação, lixiviação ou queda da folha;
- (5) O metal entra mas o metabolismo é alterado de forma a acomodar quantidades crescentes do metal tóxico: por exemplo, aumentando a quantidade das enzimas inibidas pelo metal.

4. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SOLO

A avaliação da qualidade do solo é necessária em situações diversas, por exemplo, quando se pretende avaliar o grau de contaminação de determinado solo, quando se pretende utilizar solo escavado num determinado fim específico, ou quando se pretende avaliar o uso mais correto para determinada área (Alvarenga, 2010). Mas, como medir a qualidade do solo?

Ela pode ser medida de diferentes formas, dependendo principalmente do uso que se pretende dar a esse solo. Em sentido lato, as propriedades físicas e químicas do solo determinam a sua qualidade (Alvarenga, 2010).

As propriedades físicas, como sejam a densidade, a textura e a estrutura influenciam o seu arejamento, permeabilidade, infiltrabilidade, capacidade de retenção de água e propriedades construtoras, permitindo quantificar a sua qualidade. As propriedades químicas estão relacionadas com as concentrações dos constituintes orgânicos e inorgânicos que determinam características como sejam a fertilidade do solo, atividade biológica, grau de poluição, salinidade, corrosividade, as quais também podem ser quantificadas e relacionadas com a qualidade do solo (Alvarenga, 2010).

Em Portugal, para além dos valores-limite de metais em solos existentes no Decreto-Lei nº 276/2009, relativo à aplicação de lamas residuais em solos agrícolas, e no definido na Lei de Bases do Ambiente (Lei nº 11/87, 1987), uma lei geral, não existe qualquer outro tipo de regulamentação específica nesta matéria que indique valores máximos permitidos para determinados compostos no solo. Em alguns países (Holanda, Grã-Bretanha, Canadá) encontram-se definidas Listas de Concentrações de Referência, as quais tentam estabelecer valores máximos para determinados contaminantes no solo que possam ser usados na avaliação da sua qualidade, em função do seu uso, ou estabelecer valores máximos, acima dos quais seja necessária a intervenção no local (Alvarenga, 2010).

Em Portugal foram aconselhados, pelo extinto Instituto de Resíduos, os critérios de qualidade Canadenses (*Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*) (CCME, 2006). Estes critérios de qualidade apresentam valores de referência para determinados contaminantes no solo, em função do uso que se pretende dar a esse solo (*e.g.* uso agrícola, uso habitacional/recreacional, uso comercial, ou uso industrial) (Alvarenga, 2010).

Na Tabela 1. encontra-se um excerto relativo aos valores de referência para os metais totais, os quais são, como veremos mais adiante, criticáveis quando se pretende avaliar a sua mobilidade e toxicidade do solo.

Tabela 1. Valores de referência para alguns metais existentes nas normas Canadenses (*Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health* informação actualizada em Novembro de 2006, acedida em: http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html?category_id=124, a 20/07/2011) (CCME, 2006).

| Metal | Ano de revisão ou publicação | Uso do solo | | | |
|-----------------|------------------------------|-------------|--------------------------|-----------|------------|
| | | Agricultura | Habitacional/ Parques | Comercial | Industrial |
| As | 1997 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Ba | 2003 | 750 | 500 | 2000 | 2000 |
| Cd | 1999 | 1,4 | 10 | 22 | 22 |
| Cr Total | 1997 | 64 | 64 | 87 | 87 |
| Cr (VI) | 1999 | 0.4 | 0,4 | 1,4 | 1.4 |
| Cu | 1999 | 63 | 63 | 91 | 91 |
| Pb | 1999 | 70 | 140 | 260 | 600 |
| Hg | 1999 | 6,6 | 6,6 | 24 | 50 |
| Ni | 1999 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Se | 2002 | 1 | 1 | 3.9 | 3,9 |
| Zn | 1999 | 200 | 200 | 360 | 360 |

4.1. Funções do solo

A apreciação da qualidade de um solo nunca pode ser feita de uma forma indissociada da função ou uso que se pretende dar a esse solo. Numa escala mais prática consideramos questões como sejam (Alvarenga, 2007; 2009; 2010):

- (i) A capacidade do solo para produzir produtos alimentares de qualidade;
- (ii) As propriedades e limitações de construção nesse solo;
- (iii) A capacidade desse solo para manter um ecossistema ou o uso desejado da terra.

Podemos, por isso, avaliar se o “desempenho” das funções do solo é ou não o adequado e tomar esse como um parâmetro de qualidade do solo.

As funções do solo são descritas pela FAO (1995) como sendo:

1. Função de produção: o solo suporta a produção agrícola, florestas e pastagens, que direta ou indiretamente providenciam os materiais de origem biológica, incluindo alimentos, de que o homem necessita.

2. Função de ambiente biótico: o solo constitui a base da biodiversidade terrestre, fornecendo *habitat* biológico e reserva genética para plantas, animais e microrganismos, acima e abaixo do solo.

3. Função de regulação climática: o solo, e o uso feito dele, são simultaneamente, a fonte e o destino final dos gases de efeito de estufa, possuindo um papel determinante no balanço energético global (reflexão, absorção e transformação da energia radiante do sol) bem como do ciclo hidrológico global.

4. Função hidrológica: o solo regula o armazenamento e o fluxo das águas subterrâneas, influenciando a sua quantidade e qualidade.

5. Função de armazenamento: o solo constitui uma fonte de matérias-primas, tanto inertes (*e.g.* areia, calcário, mármore) como minérios (*e.g.* Cu, Zn e Pb).

6. Função de controlo da poluição: o solo atua como recetor, como filtro e como tampão, permitindo a transformação de alguns compostos perigosos.

7. Função de construção de habitação: o solo constitui a base física da edificação de estruturas para habitações, vias de comunicação, fábricas, estruturas desportivas, etc.

8. Função de arquivo patrimonial: o solo constitui o meio de armazenamento do património histórico da humanidade, estudado na arqueologia, constituindo uma fonte de informação de ocupações de solo ancestrais, bem como de alterações climáticas passadas.

9. Função de conexão espacial: o solo proporciona o espaço para o transporte de pessoas, bens materiais, e para o movimento de plantas e animais entre áreas de ecossistemas naturais discretos.

Duma forma mais resumida as funções básicas do solo podem ser divididas em **funções socioeconômicas** e **funções ecológicas**. Estas últimas são as mais vulneráveis, as mais difíceis de preservar, e as que colocam restrições mais severas relativamente à presença de poluentes químicos no ambiente (van Straalen, 2002).

A norma ISO/DIS 17402 (2006) resume as chamadas funções ecológicas, a duas, que se definem da seguinte forma:

Função habitat: capacidade de um solo para servir como habitat de microrganismos, plantas, e animais, bem como das suas interações mútuas (biocenose);

Função de retenção: capacidade de um solo para adsorver poluentes de uma forma que eles não possam ser mobilizados pela água, de infiltração ou de escorrência, nem translocados para a cadeia alimentar terrestre.

4.2. Biodisponibilidade

O teor total de muitos compostos químicos no ambiente não permite tirar conclusões relativamente à sua toxicidade, uma vez que apenas a fração biodisponível desse composto poderá provocar *stress* e alterações fisiológicas nos organismos (Alvarenga, 2010).

Biodisponibilidade é a medida da quantidade de determinado contaminante presente no solo que pode ser absorvida ou metabolizada pelo Homem ou por outros recetores ecológicos, ou que se encontra disponível para interagir com os sistemas biológicos (ISO 11074, 2004). A biodisponibilidade não pode ser discutida sem antes se definir para quem é que essa disponibilidade é relevante, podendo esta incidir sobre diferentes alvos a proteger (Alvarenga, 2010):

Homem e organismos superiores:

- Homem;
- Animais de pasto;

- Vida selvagem.

Função habitat do solo:

- Invertebrados;
- Microrganismos do solo;
- Vegetação;
- Cadeia alimentar.

Função retenção:

- Organismos aquáticos;
- Água superficial e subterrânea.

Ou seja, a biodisponibilidade poderá ser descrita de uma forma mais específica considerando (ISO 11074, 2004):

- (Bio)disponibilidade para determinados organismos alvo ou biótipos específicos (função habitat ou função retenção);
- (Bio)disponibilidade para organismos com capacidade para transformar ou mineralizar determinados contaminantes (função habitat);
- (Bio)disponibilidade para transferência para as plantas (função habitat);
- (Bio)disponibilidade para transferência para o Homem (ingestão, inalação, contacto dérmico) (função habitat);
- (Bio)disponibilidade para processos de lixiviação (função retenção).

4.2.1. Definições de biodisponibilidade

A definição de biodisponibilidade que vimos anteriormente (ISO/DIS 17402, 2006), é bastante abrangente, mas não é suficientemente explícita de tal forma que nos forneça uma grandeza física que nos permite medir a biodisponibilidade. A biodisponibilidade depende do organismo alvo em causa e do contaminante específico, e inclui os seguintes aspetos que constituem incertezas na avaliação da biodisponibilidade (Alvarenga, 2010):

- Tempo de exposição;
- Transferência do contaminante do solo para o organismo;
- Acumulação do contaminante no organismo e seus efeitos subsequentes;
- Alguns organismos, como as plantas, podem modificar as características do solo (*e.g.* pH) tornando os contaminantes mais ou menos biodisponíveis.

A biodisponibilidade é um processo dinâmico, que pode ser descrito através dos seguintes três passos básicos (Fig. 3) (Alvarenga, 2009; 2010):

- Disponibilidade do contaminante no solo – Disponibilidade ambiental;
- Assimilação do contaminante pelo organismo – Biodisponibilidade ambiental;
- Acumulação e/ou efeito do contaminante no organismo – Biodisponibilidade toxicológica.

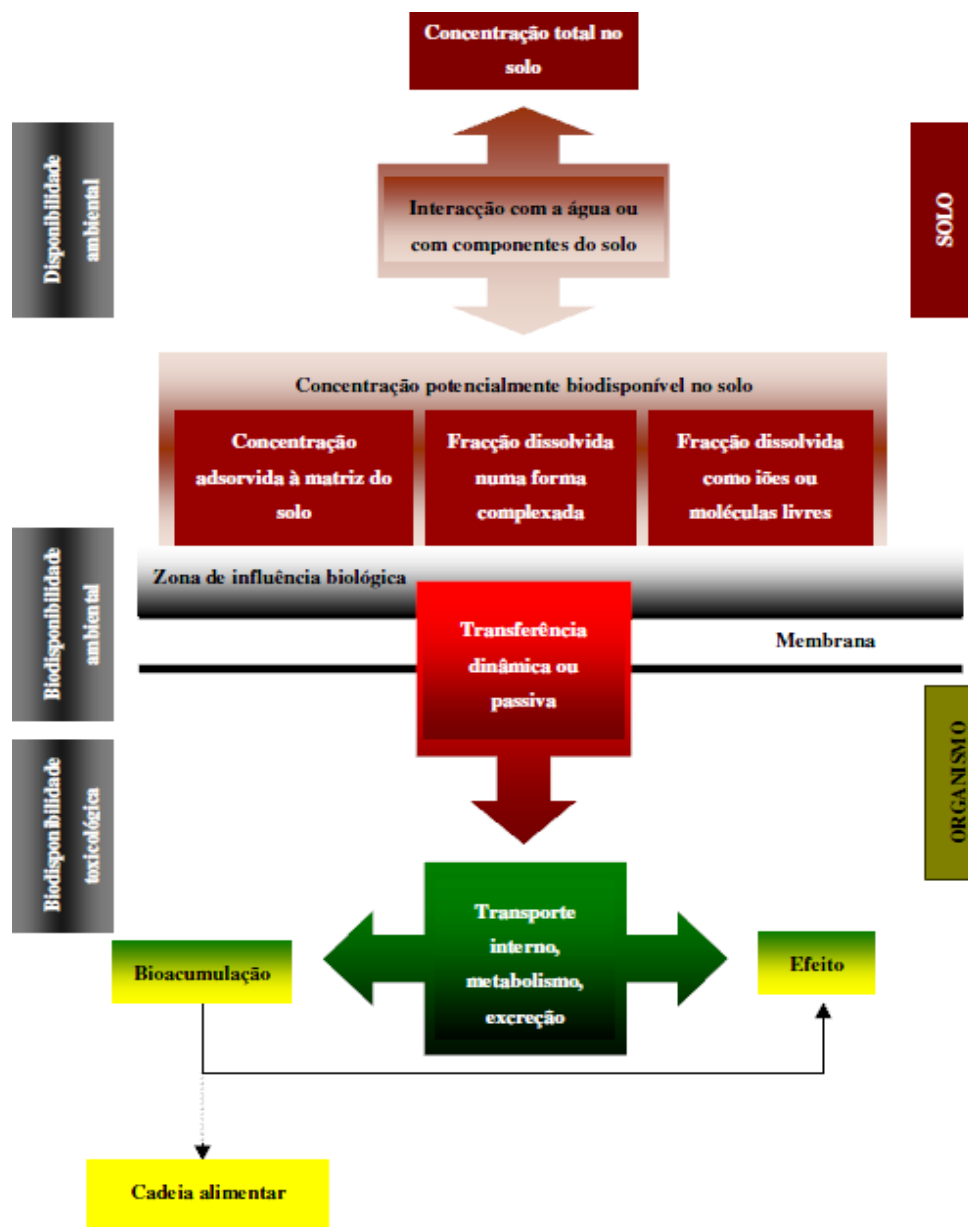


Figura 3. Da concentração total no solo ao efeito (adaptado de ISO/DIS 17402, 2006; Harmsen, 2007).

Uma vez que a exposição total do organismo ao contaminante depende do tempo, a fração disponível não é uma fração fixa, devendo ser dividida em mais do que uma fração. A abordagem mais simples consiste em considerar (ISO/DIS 17402, 2006):

- Fração efetivamente biodisponível;
- Fração potencialmente biodisponível;
- Fração não disponível.

A fração potencialmente disponível inclui a fração efetivamente disponível, não podendo exceder a concentração total. Considerando a interação organismo/solo, é importante definir uma zona, no solo, que está sob a influência direta do organismo: zona de influência biológica (Fig. 3). Esta zona compreende a água intersticial e, dependendo do organismo, parte da matriz do solo.

Consequentemente, a concentração biodisponível pode ter diferentes valores, dando origem ao aparecimento de diferentes “biodisponibilidades”, dependendo do tipo de organismo alvo e da escala de tempo o que, em consequência, dá origem à possibilidade de aparecerem numerosas definições de biodisponibilidade diferentes (definições operacionais) (ISO/DIS 17402, 2006).

4.2.2. Relação entre biodisponibilidade e efeito biológico e/ou bioacumulação

Na avaliação da biodisponibilidade num determinado tipo de solo, não deverá ser utilizado apenas um método, devendo, para além disso, ser utilizado não só o conceito de “biodisponibilidade”, mas também o conceito de “biodisponível para”, referindo-se ao organismo ou grupo de organismos em relação aos quais se está a avaliar a biodisponibilidade. A única forma direta que existe para a avaliação da biodisponibilidade, relativamente a um determinado organismo que se pretende proteger, é a utilização desse organismo, o qual se expõe ao contaminante, efetuando-se a medição do efeito e/ou da acumulação (*i.e.* biodisponibilidade toxicológica) (ISO/DIS 17402, 2006; Alvarenga, 2009).

Se tal não for possível quer por razões éticas (*e.g.* utilização de seres humanos em experimentação) ou quer por razões ecológicas (*e.g.* demasiadas espécies para serem testadas no ecossistema), uma das possíveis soluções passa pela utilização de espécies substitutas, as quais podem servir como indicadores dos efeitos potenciais e/ou acumulação no organismo que pretendemos proteger, ou num determinado grupo de organismos, ou no ecossistema total. Se a biodisponibilidade ambiental para um determinado organismo, ou um grupo de organismos do solo, puder ser mimetizada utilizando um processo químico, então a avaliação da biodisponibilidade pode ser feita recorrendo à utilização de ensaios químicos. A condição exigida para que isso se possa fazer prende-se com a necessidade da existência de uma

correlação entre o resultado do ensaio químico e a biodisponibilidade ambiental (zona B da Fig. 4) (Alvarenga, 2010).

A Figura 4. mostra a relação existente entre biodisponibilidade, efeitos biológicos e bioacumulação.

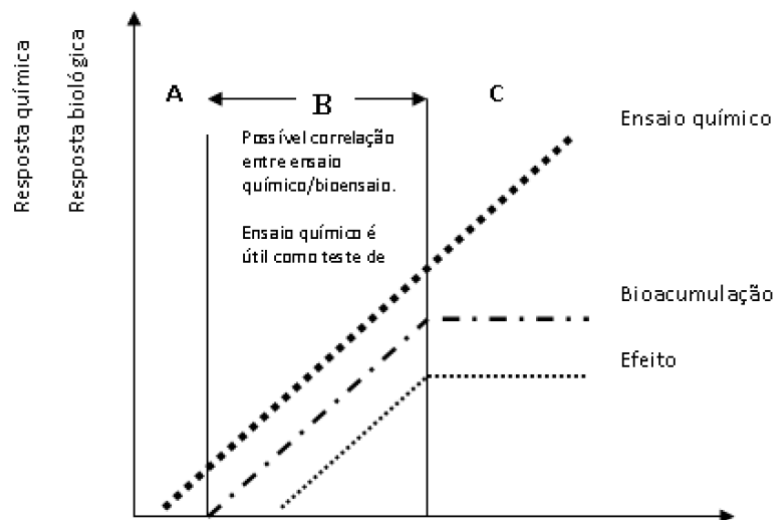


Figura 4. Representação da resposta de um ensaio químico e de um bioensaio à concentração total do contaminante (adaptado de ISO/DIS 17402, 2006).

Legenda:

Zona A: o contaminante é detectado, mas não existe ainda nenhum efeito detectável;

Zona B: as curvas de dose-resposta são paralelas para os ensaios químicos e biológicos: nesta gama de concentrações o ensaio químico constitui um bom substituto do ensaio biológico;

Zona C: a resposta dos bioensaios perde a linearidade relativamente à concentração e a correlação é perdida.

Através da análise da Figura 4. é possível verificar que apenas na parte B do gráfico é que os testes químicos e biológicos fornecem respostas paralelas, o que significa que os métodos químicos podem ser utilizados em substituição dos biológicos (ISO/DIS 17402, 2006; Harmsen, 2007; Alvarenga, 2009). A concentração interna, que resulta da entrada e acumulação do contaminante no organismo, pode ser utilizada na ligação ao efeito observado, desde que o organismo não tenha capacidade de eliminação do contaminante (Alvarenga, 2009).

4.2.3. Avaliação da biodisponibilidade

A biodisponibilidade pode ser avaliada de duas formas complementares, usando métodos químicos ou métodos biológicos (Alvarenga, 2009; 2010):

Métodos químicos (*e.g.* métodos de extração) que avaliam a fração disponível de uma determinada classe de contaminantes para determinados recetores específicos (*e.g.* macro- e meso-fauna do solo) ou a sua mobilidade no solo. Normalmente estes métodos químicos são desenvolvidos por forma a prever a quantidade de contaminante potencialmente ingerido pelo organismo. Apesar de serem métodos empíricos, os resultados analíticos obtidos podem ser correlacionados com os efeitos. Os métodos químicos podem substituir os métodos biológicos, se tiver sido demonstrada a existência de correlação entre os resultados químicos e o efeito acumulação, como vimos anteriormente.

Métodos biológicos, os quais expõem os organismos ao solo (métodos diretos) ou aos eluatos do solo (métodos indiretos), por forma a monitorizar os efeitos. Se se observar acumulação do contaminante e/ou efeitos (*e.g.* mortalidade, inibição do crescimento), é provável que exista biodisponibilidade de determinado(s) contaminante(s), mesmo que este(s) não consiga(m) ser quimicamente identificados.

4.2.3.1. Utilização de métodos químicos na avaliação da (bio)disponibilidade ambiental

São vários os métodos desenvolvidos com o propósito de avaliar a disponibilidade ambiental de um determinado contaminante. Os mais simples são os ensaios de lixiviação, os quais foram desenvolvidos para prever o transporte de contaminantes do material solo (*e.g.* solo ou resíduos) para a água. Embora sejam várias as metodologias usadas nos ensaios de lixiviação, todas elas utilizam água destilada como extratante (Alvarenga, 2009; 2010), tendo sido objeto de normalização os principais sistemas de normas internacionais (DIN 38414-S4, 1984; ISO/TS 21268-1, 2007; ISO/TS 21268-2, 2007; ISO/TS 21268-3, 2007; ISO/TS 21268-4, 2007). Os eluatos obtidos recorrendo aos ensaios de lixiviação referidos são considerados apropriados para uso nos ensaios de ecotoxicidade (ISO/DIS 17402, 2006).

As metodologias de extração química de passo único ou sequenciais são utilizadas para prever a retenção/libertação de metais em solos, sedimentos ou lamas, avaliar a sua biodisponibilidade ou efetuar a sua especiação (Alvarenga, 2009; 2010).

A extração da fração móvel/ efetivamente biodisponível pode ser efetuada utilizando soluções salinas, como por exemplo de CaCl_2 , NH_4NO_3 ou NaNO_3 , que simulam a

concentração de metal existente na solução do solo e, como tal nos permitem avaliar a concentração de metal que se encontra disponível para absorção pelas plantas (Alvarenga, 2009).

A extração da fração mobilizável/ potencialmente biodisponível envolve não só a fração do contaminante existente na solução do solo, e em equilíbrio com ela, mas também a fração do contaminante que poderá para ela ser extraída com a modificação das condições ambientais (*e.g.* aumento da acidez do solo, aumento da matéria orgânica solúvel) (ISO/DIS 17402, 2006; Alvarenga, 2009).

Esta fração mobilizável pode ser extraída, por exemplo, utilizando uma solução extratante composta por $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ + EDTA (acidificada) ou uma solução de EDTA (pH 7) (Gupta *et al.*, 1996; Alvarenga, 2009). Porém, estes métodos de extração são empíricos e conseguem apenas estimar a disponibilidade de nutrientes ou poluentes para os organismos ou a forma/fração de um metal específico numa matriz de interesse. Para além disso, os resultados que se podem obter são muito dependentes do protocolo utilizado na extração. Estes fatores têm contribuído para o facto de ainda não haver nenhum protocolo de extração química normalizado na avaliação da (bio)disponibilidade ambiental de compostos no solo (Alvarenga, 2009).

4.2.3.2. Utilização de métodos ecotoxicológicos na avaliação da biodisponibilidade toxicológica

Como foi justificado, as análises químicas podem ser insuficientes para a caracterização do risco ecológico de um solo ou de um resíduo, uma vez que elas não permitem uma avaliação dos efeitos combinados dos diferentes constituintes/contaminantes aí existentes, que exercem um determinado efeito no ambiente, consequência da sua biodisponibilidade (Alvarenga, 2010). Os ensaios ecotoxicológicos podem mitigar este constrangimento, devendo ser utilizados, em combinação com a caracterização química, na avaliação da qualidade de um solo ou de um resíduo, na análise do seu risco ecológico, bem como na avaliação da eficácia das ações de remediação preconizadas para um determinado local (Alvarenga, 2009). Em particular, a biodisponibilidade deverá ser considerada de uma forma mais ampla, por forma a incluir uma gama variada de recetores ecológicos e de níveis tróficos (ISO/DIS 17402, 2006).

Os testes de ecotoxicidade de solos descritos na literatura podem ser classificados como (van Gestel *et al.*, 2001; Alvarenga, 2009):

- **Testes agudos** ou como testes crônicos, dependendo do tempo de exposição do organismo ao contaminante,
- **Ensaio direto**, que colocam o organismo em contacto direto com o solo a testar - testam a função habitat do solo, ou
- **Ensaio indireto**, que utilizam espécies aquáticas, as quais são colocadas em contacto com os extratos do solo – testam a função de retenção desse solo. Recomenda-se o uso de uma bateria de testes, incluindo várias espécies representativas do ecossistema em avaliação, ensaios agudos, crônicos e reprodutivos e, se possível, utilização de organismos terrestres e aquáticos.

Podem utilizar-se diferentes organismos do solo:

- **Microrganismos do solo:** estes ensaios avaliam processos como a mineralização do azoto e a nitrificação (ISO 14238, 1997; ISO 15685, 2004), a determinação da biomassa microbiana (ISO 14240-1, 1997; ISO 14240-2, 1997), ou a atividade enzimática da desidrogenase (ISO 23753-1, 2002);
- **Mesofauna do solo:** reprodução de *Enchytraeus albidus* (ISO 16387, 2004) e de *Folsomia candida* (ISO 11267, 1999);
- **Macrofauna do solo:** mortalidade (ISO 11268-1, 1998), reprodução (ISO 11268-2, 1998) e evitamento (ISO/DIS 17512, 2003) de *Eisenia fetida*;
- **Plantas:** emergência e crescimento de mono e dicotiledóneas (ISO 11269-1, 1993; ISO 11269-2, 1995; ISO/DIS 15799, 1999).

4.2.3.3. Ensaio ecotoxicológicos que utilizam plantas

Os ensaios ecotoxicológicos que recorrem à utilização de plantas são considerados ferramentas versáteis na avaliação da contaminação de um solo, permitindo-nos identificar o efeito dos contaminantes presentes (Kapustka e Reporter, 1993; Dorn *et al.*, 1998; van Gestel *et al.*, 2001; Loureiro, 2004; Alvarenga, 2009). Para além disso, é importante o papel desempenhado pelo solo como matriz física para o desenvolvimento da planta. Solos com uma estrutura deficiente, e com macro e micro-porosidade insuficientes, podem afetar a germinação da semente, a penetração e o crescimento da raiz, a capacidade de retenção de água essencial para suprir as necessidades hídricas da planta, as trocas gasosas ao nível da raiz e, como consequência, terem um impacto considerável sobre a biomassa vegetal da cultura (Alvarenga, 2009).

A seleção de uma planta monocotiledónea e de outra dicotiledónea permite a obtenção de uma informação mais ampla acerca do impacto do material em análise nas fases iniciais do desenvolvimento de diferentes tipos de plantas (Alvarenga, 2009).

Alguns autores utilizaram os ensaios de germinação ou alongamento de raiz como ensaios de toxicidade direta, colocando as sementes, durante cinco dias, diretamente em contacto com o solo (Phillips *et al.*, 2000; Alvarenga, 2009). Neste caso, os autores consideraram, face aos resultados obtidos com *Latuca sativa L.*, ser este um dos testes mais fiáveis na avaliação da toxicidade de solos.

De acordo com Kapustka e Reporter (1993), os ensaios de germinação, muitas vezes valorizados por representarem uma fase muito crítica e sensível do ciclo de vida das plantas, são, de facto, insensíveis a muitas substâncias tóxicas. Este facto pode ser explicado por dois motivos principais:

1. Muitos compostos químicos podem não chegar a ser absorvidos pela semente;
2. A planta embrionária supre as suas necessidades nutricionais internamente, dos materiais de reserva da semente, facto que, de certa forma, provoca o seu isolamento do ambiente em que se encontra.

4.2.3.4. Ensaios ecotoxicológicos que utilizam a fauna do solo

Dentre os organismos de solo, as minhocas compreendem de 40% a 90% da biomassa de macrofauna da maioria dos ecossistemas tropicais (Fragoso *et al.*, 1999). A sua importância é imensa visto que têm papel destacado na formação do solo; na decomposição de resíduos de plantas e reciclagem de nutrientes da matéria orgânica; na formação do húmus e de agregados de solo, onde a atividade biológica é mais intensa; no melhoramento da estrutura, fertilidade, porosidade e capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água, ar e também no transporte de microrganismos e nutrientes do solo por meio dos canais formados pela escavação e pelos seus deslocamentos no solo (Ingham, 2006).

Assim, os testes da OECD (Organização Europeia de Cooperação e Desenvolvimento Económico), da EPA (Agência Americana de Proteção do Ambiente) e da ISO (Organização Internacional para Padronização) entre outros, adotaram a espécie *Eisenia fetida* para os testes de toxicidade aguda e, posteriormente, para os testes de reprodução e evitamento.

Entretanto, com o decorrer do tempo sobre a proposição e adoção desses testes, muitas críticas foram elaboradas a partir de resultados de vários estudos. O teste de toxicidade aguda, por exemplo, é criticado principalmente porque se baseia em dados de mortalidade após

apenas 14 dias de contacto de apenas uma espécie de minhoca (geralmente *E. fetida*) com um substrato totalmente artificial (mistura de proporções fixas de turfa, caulino e areia industrial, com pH ajustado em 6 por adição de carbonato de cálcio) tratado com o poluente. A composição desse substrato e o pH não representam, por exemplo, as condições naturais de solos e as minhocas apenas representam uma parte da fauna do solo (Crouau *et al.*, 1999). Estes autores sugerem a utilização de um ensaio baseado em artrópodes do solo, como sejam o colêmbolo *Folsomia candida*. Lock e Janssen (2003), na avaliação da toxicidade de vários tipos de sais de Zn em solos, usaram os três tipos de organismos do solo sugeridos nas normas ISO: *Enchytraeus albidus*, *F. candida* e *E. fetida*.

Porém, apesar das críticas, em estudos comparativos de vários ensaios ecotoxicológicos, Bierkens *et al.* (1998) verificaram que a perda de peso de *E. fetida* era um dos ensaios mais sensíveis na avaliação da qualidade do solo e, outros autores, chegaram à mesma conclusão, usando o teste de mortalidade de *E. fetida* (Dorn *et al.*, 1998; Phillips *et al.*, 2000; Alvarenga, 2009).

Por outro lado, estes testes fornecem outras vantagens, tais como: a relativa facilidade de criação de minhocas do género *Eisenia*; as condições desses testes são internacionalmente aceites; permitem padronização de estudos e comparações internacionais; fornecem estimativas sobre toxicidade relativa às espécies endémicas; permitem avaliações preliminares em relação a intervalos de doses do poluente em estudo, e fornecem estimativas iniciais sobre o valor de NOEC (concentração sem efeito observável) para exposição contínua. Assim, conforme ressaltam Reinecke e Reinecke (2004), embora se verifique atualmente uma tendência para a utilização de novos bioensaios, os testes de toxicidade com minhocas ainda são considerados uma referência.

4.2.3.5. Utilização de métodos bioquímicos na avaliação da qualidade do solo

Os microrganismos do solo incluem bactérias, actinomicetes, fungos, algas e protozoários. Dentre estes, as bactérias representam o grupo mais numeroso, desempenhando um papel muito importante na decomposição e transformação de compostos no solo quer estes sejam de origem natural ou de origem antropogénica. A avaliação da qualidade de um solo deverá, por isso, contemplar a caracterização da sua atividade microbiológica, podendo esta ser estimada com recurso à (Alvarenga, 2009; 2010):

- Quantificação da biomassa microbiana;

- Determinação da atividade bioquímica relacionada com os ciclos dos nutrientes (*e.g.* C, N, P e S);
- Medição da atividade enzimática de determinadas enzimas específicas (*e.g.* β -glucosidase, fosfatases ácida, celulases, proteases, urease e desidrogenase).

Os parâmetros bioquímicos, segundo Gil-Sotres *et al.* (2005) podem ser classificados em dois grandes grupos:

- **Parâmetros bioquímicos gerais** (*e.g.* C na biomassa microbiana, atividade da desidrogenase, potencial de mineralização do azoto). Dos parâmetros bioquímicos gerais, o C na biomassa microbiana é considerado o mais rigoroso (41% dos autores), seguido pela atividade da desidrogenase (28%) e pelo potencial de mineralização do azoto (16%) .
- **Parâmetros bioquímicos específicos** (*e.g.* atividade das enzimas hidrolíticas, como as fosfatases, a urease e a β -glucosidase).

A maioria das enzimas encontra-se ativa nas células vivas, as chamadas enzimas intracelulares. Porém, tanto os microrganismos como as plantas excretam um determinado número de enzimas para o solo, as chamadas enzimas extracelulares, as quais promovem a transformação de muitos dos compostos que não conseguem atravessar a membrana celular microbiana (*e.g.* polímeros proteicos de elevado peso molecular, lenhinas, celulose) (van Beelen e Doelman, 1997; Alvarenga, 2009). Estas enzimas extracelulares sofrem degradação no solo, mas a sua adsorção aos minerais de argila pode estabilizá-las (van Beelen e Doelman, 1997; Huang e Shindo, 2000; Alvarenga, 2009).

As fosfatases (28%), a β -glucosidase (16%) e a urease (11%) são as enzimas mais frequentemente utilizadas de entre os parâmetros bioquímicos específicos, representando, de forma adequada, os ciclos do P, C e N (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Alvarenga, 2009).

A fosfomonoesterase ácida, ou fosfatase ácida, é uma das muitas fosfatases que atua no solo, constituindo enzimas chave no ciclo do fósforo. A fosfatase ácida é uma das principais responsáveis pela mineralização dos compostos orgânicos fosfatados em solos ácidos. Esta tem sido uma das hidrolases utilizadas com maior frequência na previsão de alterações na qualidade de solos provocadas pelo manejo agrícola ou pela presença de contaminantes, constituindo um bom indicador da qualidade e da quantidade da matéria orgânica no solo. Há referências ao facto da atividade desta enzima diminuir na presença de

Pb (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Alvarenga, 2009) e de outros metais pesados, entre eles Cd, Zn e Cu (Renella *et al.*, 2003).

Por seu turno, a β -glucosidase é uma enzima extracelular relacionada com o ciclo do carbono, a qual desempenha um papel importante na degradação da matéria orgânica. A β -glucosidase está envolvida no passo final da degradação da celulose, catalisando a hidrólise de carboidratos com ligações β -D-glucósido, como a celobiose, proporcionando substratos energéticos para os microrganismos heterotróficos do solo. Esta tem sido uma das enzimas envolvidas no ciclo do carbono mais utilizada na avaliação da qualidade de solos (Alvarenga *et al.*, 2009). Alguns autores referem que a atividade desta enzima é marcadamente reduzida para elevadas concentrações de metais pesados (Kuperman e Carreiro, 1997; Kunito *et al.*, 2001; Hinojosa *et al.*, 2004), mas Pérez-de-Mora *et al.* (2005) sugerem que o principal factor que regula a sua atividade é o teor em matéria orgânica no solo.

A atividade da desidrogenase é, normalmente, imputada a um grupo de enzimas endocelulares que transferem hidrogénio e eletrões das moléculas dos substratos para aceitadores apropriados, durante as fases iniciais da oxidação dos compostos orgânicos. Os eletrões são transferidos ao longo da cadeia de aceitadores eletrónicos até ao oxigénio, que desempenha o papel de aceitador final de eletrões, levando à formação de água (Chander e Brookes, 1991). Sendo esta uma enzima intracelular, com uma atividade intimamente ligada à da célula, a medição da sua atividade tem sido considerada um bom indicador geral da atividade microbiana no solo, tendo sido utilizada na avaliação da qualidade de solos afetados por contaminação por pesticidas ou por metais, bem como no diagnóstico de ações de recuperação de solos degradados (Kunito *et al.*, 2001; Kızılkaya *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Pérez-de-Mora *et al.*, 2005; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Alvarenga, 2009).

A atividade da urease refere-se ao ciclo do azoto, onde é responsável pela catálise da reação de hidrólise da ureia a CO_2 e NH_3 . Esta é, também, uma enzima largamente utilizada na avaliação da qualidade de solos, cuja atividade aumenta em consequência da adição de fertilização orgânica ao solo, desempenhando um papel fundamental na disponibilização de azoto necessário para as culturas e para a atividade microbiana no solo (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Kunito *et al.* (2001) verificaram que a atividade desta enzima é reduzida devido à contaminação de Zn no solo.

O uso da atividade enzimática de uma única enzima tem sido criticada por alguns autores, uma vez que cada enzima catalisa uma determinada reacção específica, recorrendo a um único tipo de substrato, fornecendo, por vezes, resultados muito diferentes para diferentes

enzimas no mesmo solo. De facto, é aconselhável o recurso à determinação da atividade enzimática de uma bateria de enzimas na avaliação da qualidade de solos, tentando relacioná-las com outras propriedades bioquímicas do solo, para que a avaliação da sua qualidade seja o mais completa possível (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Loureiro, 2004; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Alvarenga, 2009).

Embora, de uma maneira geral, se verifiquem correlações negativas entre a atividade enzimática e o teor em metais pesados (Kuperman e Carreiro, 1997; Huang e Shindo, 2000; Lee *et al.*, 2002; Kızılkaya *et al.*, 2004), diversos trabalhos demonstram a utilidade das avaliações de atividades enzimáticas dos solos na determinação de sua saúde e qualidade (Bergstrom *et al.*, 1998; Bandick e Dick, 1999; Monreal e Bergstrom, 2000; Mendes e Vivaldi, 2001; Garcia *et al.*, 2002; Schmitz, 2003; Matsuoka, 2006; Alvarenga, 2009). Mas esta opinião não é unanime, tendo, nalguns casos, sido verificado que o facto de um solo ter um teor superior em metais pesados não se repercute ao nível da atividade enzimática de todas as enzimas utilizadas na caracterização bioquímica desse solo (Hinojosa *et al.*, 2004; Kızılkaya *et al.*, 2004). Por isso, para além do uso das atividades enzimáticas como índices simples, estas podem ser usadas em combinação, utilizando equações complexas derivadas de relações matemáticas entre elas (Hinojosa *et al.*, 2004; Gil-Sotres *et al.*, 2005), combinadas em análises estatísticas de variável múltipla (Hinojosa *et al.*, 2004), ou ainda recorrendo à combinação das atividades enzimáticas com outras características importantes do solo, como sejam o C na biomassa microbiana e a capacidade de mineralização de azoto desse solo (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Loureiro, 2004; Alvarenga, 2009).

5. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA MINEIRA EM ESTUDO

5.1. A Mina de São Domingos

A Mina de São Domingos localiza-se na Faixa Piritosa Ibérica (FPI), mundialmente reconhecida pela sua riqueza em sulfuretos maciços vulcanogénicos (Fig. 5). Situada na margem esquerda do Rio Guadiana, no concelho de Mértola, Baixo Alentejo, esse complexo desenvolveu-se ao longo dos cerca de 17 km da sua linha-férrea, entre a Mina e o Pomarão, porto fluvial de embarque do minério situado na confluência com o Rio Chança. Em razão das suas excelentes condições geológicas e geográficas chegou a ser a mina de cobre mais importante da Europa, alcançando produções superiores a 400.000 toneladas de minério por ano (1911-1912), com cerca de 3.000 trabalhadores e perto de 6.000 habitantes instalados nas aldeias da Mina de São Domingos e do Pomarão (Carvalho, 2009).

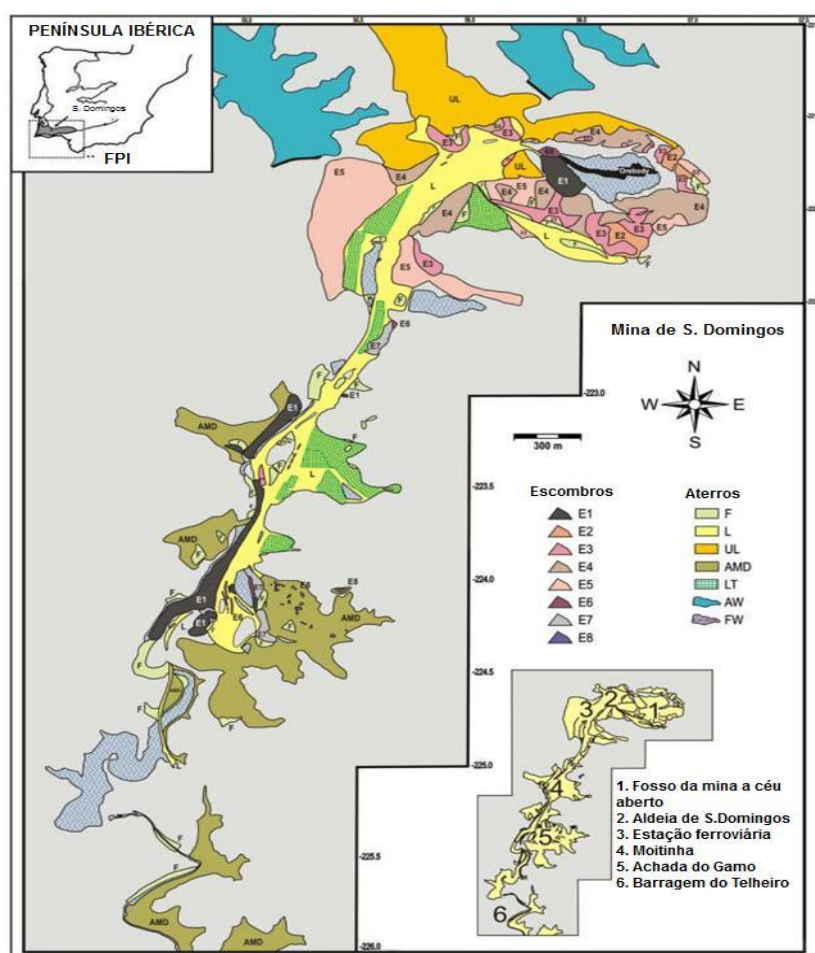


Figura 5. Localização da Mina de São Domingos no sector Português da Faixa Piritosa Ibérica (adaptado por Álvarez-Valero *et al.*, 2008).

5.2. Enquadramento histórico da Mina de São Domingos

O depósito pirítico de São Domingos foi explorado antes da época moderna em, pelo menos, dois períodos históricos, porém alguns autores admitem explicitamente uma mineração Calcolítica em São Domingos (Alvarez-Valero *et al.*, 2008; Custódio, 1996). Não tendo sido ainda demonstrada, a possibilidade de mineração do depósito de São Domingos durante o Calcolítico é uma hipótese com altas probabilidades. Durante a época romana foram extraídos cobre, prata e, provavelmente, ouro, a partir do *gossan*, durante o milénio anterior à ocupação romana foram explorados os mesmos depósitos secundários mas, provavelmente, apenas para a extração de prata. Posteriormente verificou-se uma forte deformação tectónica das rochas gerando-se vários tipos de dobras e planos de clivagem. Este evento geológico encontra-se associado à edificação de uma cadeia de montanhas (orogenia varisca) que ocorreu no final do Paleozóico Superior. As principais formações geológicas da região de Mértola, de idade Paleozóica Superior (entre 364 e 327 milhões de anos) são caracterizadas pelas diferentes tipologias de rochas sedimentares e vulcânicas e pelo seu conteúdo fossilífero (Custódio, 2002).

Durante o período Islâmico poderá ter sido explorada qualquer uma das virtualidades mineiras (Macias, 1999), reconhecendo-se a presença islâmica (Custódio, 2002) e sendo certo que três moedas árabes foram anunciadas como parte do espólio da mineração antiga em São Domingos presente na Exposição Internacional do Porto em 1865 (Custódio, 2002). A exploração moderna incidiu sobre a massa de pirite inalterada, procurando, essencialmente, sulfuretos maciços de cobre com teores elevados de As, Zn e Pb e, colateralmente, o S.

A exploração em larga escala foi iniciada no século XIX no *gossan* e nos sulfuretos maciços, ultrapassando os cem anos de atividade. Para além do Cu, pelo qual foi explorada, a mineralização de São Domingos era rica em outros elementos vestigiais gravosos para o ambiente como Sb, As, Hg, Pb e Zn. Em meados do século XIX, a procura de metais estava em crescendo na Europa e na América do Norte. Por essa altura (1850-51) foram publicados na *Revista Minera*, por João Maria Leitão, artigos referindo e chamando a atenção para os vários depósitos piríticos Portugueses explorados em épocas antigas. No último dia do ano de 1852, foi exarada pelo governo Português uma nova lei de minas, que abriu à iniciativa privada a exploração dos depósitos minerais Portugueses. Em 1853, um empresário de minas Francês com atividade na FPI Espanhola, Ernest Deligny, procurando alargar a atividade além da região já conhecida de Rio Tinto, iniciou a exploração da zona fronteira Espanhola e encontrou os trabalhos antigos e os depósitos de pirite de Tharsis, Calañas e Vuelta Falsa,

entre outros. No ano seguinte, 1854, um Italiano de nome Nicolau Biava residente no Alosno (Huelva, Espanha) e capataz numa das minas dirigidas por Deligny, registou a descoberta de vários depósitos de pirite já explorados em épocas antigas no território Português. Especificamente, em 16 de Junho de 1854, Nicolau Biava requereu à Câmara Municipal de Mértola o direito de descobridor legal das Minas de São Domingos 1 e 2, da Mina da Bicada (imediate aos dois depósitos de São Domingos) e da Mina do Cerro do Ouro, 5 km para Nordeste dos sítios antes mencionados, junto à Ribeira de Chança, fronteira entre Espanha e Portugal (Guita, 2011).

No ano seguinte, prosseguindo a sua política de aquisição de direitos legais sobre depósitos minerais, Ernest Deligny comprou ao seu capataz Nicolau Biava os direitos sobre os quatro depósitos que este havia registado na região de São Domingos. Entre 1855 e 1857 a atividade mineira na Mina de São Domingos foi tendo lugar, apesar de não estar legalmente habilitada, sob a égide de Deligny e Biava, consistindo no desentulhamento e esgotamento dos trabalhos antigos. Para a exploração do depósito de São Domingos, aquele que apresentava as condições mais favoráveis e interessantes, foi constituída a empresa La Sabina, tendo como sócios três cidadãos franceses: Ernest Deligny, Eugène Duclerc e Louis Descazes. Foi a estes três empresários em nome individual que foi feita pelo estado Português, em 12 de Janeiro de 1857, a concessão provisória da Mina de São Domingos. Uma vez adquirido este direito, a empresa La Sabina arrendou a exploração da Mina de São Domingos a uma empresa inglesa, entretanto constituída, denominada Mason & Barry (Guita, 2011).

A partir do momento em que a Mina de São Domingos foi arrendada à empresa Mason & Barry, desenvolveu-se um empreendimento mineiro moderno sobre um território com a extensão máxima superior a 20 km lineares de Norte a Sul (Cerro do Ouro ao Pomarão), com uma superfície superior a 6.000 ha, o qual alterou radicalmente 296 destes hectares, mobilizou mais de 20 milhões de toneladas de materiais, produziu cerca de 14,7 milhões de toneladas de resíduos acumulados em escombreciras de até 14 m de altura com uma dezena de materiais diferentes (pirite, *gossan*, escórias, cinzas, óxidos de ferro, rocha estéril, lamas, entulhos, etc.), quartéis para os mineiros (as habitações, construídas pela empresa e arrendadas aos trabalhadores), oficinas e armazéns, equipamentos de tração, de esgoto e de extração, vários equipamentos de carácter social (hospital, igreja católica, cemitério protestante, teatro, clube recreativo, mercado, campo de jogos), o porto fluvial do Pomarão, indispensável ao escoamento do minério, cinco núcleos urbanos (de Sul para Norte, Pomarão, Telheiro, Achada do Gamo, Moitinha e Mina de São Domingos), algumas centenas de hectares

ocupados com matas de exóticas (*Eucalyptus spp.* e *Pinus spp.*), outras tantas ocupadas com reservatórios de água doce e água ácida (Guita, 2011).

As excelentes condições de produção e escoamento fizeram da Mina de São Domingos, logo em 1864, a primeira mina da Europa, com grande parte da sua produção dirigida ao mercado inglês (Carvalho, 2009).

Inicialmente, a exploração do subsolo decorre em profundidade e em extensão, expandindo os poços de acesso e ventilação da mina e galerias do período romano. Uma década depois, um segundo modelo de desenvolvimento industrial do complexo exigia importantes transformações estruturais sobre a realidade até então construída. Nesse ano, foi implementado o sistema de lavra a céu aberto, para aumentar a produção e reduzir os custos de exploração. Desenvolviam-se encosta acima, por entre os trabalhos de superfície. A extração intensiva do minério, segundo o método de corta, leva à expansão do complexo mineiro. Um novo assentamento nasceu à medida que as grandes escavações sobre a serra iam engolindo as edificações e infra-estruturas existentes. No início do séc. XX, acentua-se o incremento da metalurgia em resposta às sucessivas crises do mercado do Cu e à crescente procura de S por parte da indústria química. O aproveitamento desta substância conduz à instalação de uma fábrica em São Domingos, destinada exclusivamente à produção de e S. Esta unidade construída em 1935, na Achada do Gamo, incorporava a mais atualizada tecnologia da época (Carvalho, 2009).

Crises significativas de falta de minério, por altura da II Grande Guerra, têm como consequência o aprofundamento das zonas de extração até ao nível 390 m. Mas, em 1962, o fim da laboração da fábrica de enxofre é o prenúncio do esgotamento do jazigo e do encerramento da Mina de São Domingos, que ocorre em 1966. Durante os 107 anos de exploração (1859-1966), foram extraídas cerca de 20 milhões de toneladas de pirite cúprica. Em 1968 a empresa Mason & Barry faliu com dívidas a trabalhadores e segurança social. O ritmo de reconversão da Mina de São Domingos tem sido lento e de amplitude reduzida. Poucos objetivos foram alcançados e os desígnios estratégicos da preservação e reabilitação do património e do desenvolvimento, não foram conseguidos. O território da antiga Mina de São Domingos, outrora espaço de labor intenso, propulsor do desenvolvimento da região e do país, é hoje um espaço de degradação ambiental e de depressão social e económica (Carvalho, 2009).

5.3. Contaminação dos solos na zona mineira de São Domingos

À exceção da Mina de Neves Corvo, todas as explorações do sector português da FPI apresentam impactes ambientais significativos. A Mina de São Domingos tem sido estudada por vários autores (Alvarenga, 1997; Oliveira, 1997; Matos e Rosa 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2003; Quental *et al.*, 2005; Matos e Martins, 2006) conhecendo-se razoavelmente os efeitos aí provocados pela atividade extrativa. A inexistência de políticas protetoras do ambiente no seu processo de encerramento traduz-se actualmente, numa pesada herança. A mina encontra-se abandonada, apresentando apenas as ruínas e áreas significativas cobertas por escombros de rocha encaixante da mineralização, minério, escórias e materiais lixiviados estimando-se que o seu volume seja respectivamente de >5 Mt, 5 Mt e cerca de >2 Mt (Fig. 6). Na área de influência direta das explorações mineiras os solos encontram-se afetados, observando-se porém uma contaminação pouco dispersa o que permite o desenvolvimento da floresta de eucalipto. A área mineira caracterizam-se ainda pela insegurança das suas cortas e poços, os quais se encontram geralmente desprotegidos. A utilização de escombros para pavimentação de caminhos e construção de aterros, por parte de privados e de serviços municipais, é responsável por situações de elevada instabilidade verificadas em algumas das escombreliras da Mina de São Domingos. Esta atividade favorece ainda a disseminação dos elementos contaminantes pela envolvente das explorações e o desgaste rápido e ruptura dos corpos de escombros mais volumosos, com o consequente transporte de finos para a rede hidrográfica. Na Mina de São Domingos foram também observados fenómenos preocupantes de erosão por abarrancamento e/ou deslizamento, muitas vezes facilitados pela ausência de cobertura vegetal (Matos e Martins, 2006). Em certos locais observa-se também o mau uso das infra-estruturas como depósito de lixo (sucata, monos, doméstico e animais mortos) e de entulhos.

A Ribeira de São Domingos, afluente do Rio Chança constitui o curso de água que se encontra mais afetado pela drenagem não controlada de efluentes ácidos, com elevadas concentrações de Fe, Al, Mn, Co, Cu, As, Sb e Ni, provenientes da área mineira de São Domingos. Os troços da rede hidrográfica situados a jusante deste centro mineiro encontram-se afectados em vários quilómetros com águas de pH ácido (<3) e elevada condutividade eléctrica (Fig. 6). A presença de condições ambientais atípicas neste vale constitui, por outro lado, um factor de biodiversidade existindo várias espécies de plantas (esteva, *Cistus ladanifer* L. e urze, *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera, esta foi descrita pela primeira vez por Cabezudo e Rivera em 1980 (Aparício, 1995)), animais (microvertebrados) e

microorganismos (arqueobactérias) adaptados às condições adversas de baixo pH e elevada concentração de metais (Matos e Martins, 2006).

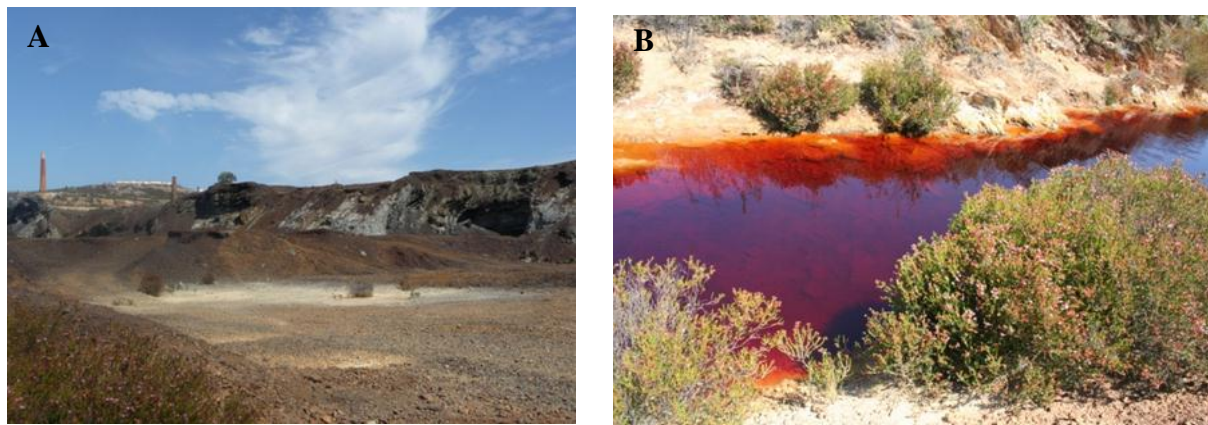


Figura 6. (A) Escórias e escombreliras resultantes da extração mineira, e (B) curso de água junto à Achada do Gamo (Mina de São Domingos) onde é visível a influência da drenagem ácida.

Com o encerramento da atividade extrativa a corta de São Domingos foi progressivamente inundada por águas ácidas com pH inferior a 2,5-3. Em torno da cavidade é possível observar vários tipos de escombreliras constituídas por materiais diversos como escórias modernas de cor negra, escórias romanas acastanhadas, fragmentos de *gossan* de cor avermelhada e rochas encaixantes da mineralização, como vulcanitos e xistos. Alguns destes corpos de escombros apresentam teores significativos de ouro admitindo-se a presença de 1 Mt de escombreliras com cerca de 1 g/ton Au (Malavé e Bedia, 1991; Matos, 2004; Oliveira e Matos, 2004; Matos e Martins, 2006).

Entre os campos de lixiviação de minério da Moitinha, as fábricas de produção de enxofre da Achada do Gamo e a barragem do Chumbeiro, localizada cerca de 5 km a jusante, evidenciam-se amplas superfícies não vegetadas afetadas pela drenagem ácida da mina, relacionada com os métodos de processamento dos sulfuretos e com o controle de águas ácidas ao longo do vasto sistema de canais mineiros (Matos e Martins, 2003).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Área de estudo

A área da Mina de São Domingos é caracterizada por um clima tipicamente Mediterrânico com Verões secos e quentes e Invernos pouco chuvosos e frios (Quental *et al.*, 2002). Na região verificam-se as mais baixas precipitações do país e os mais elevados níveis de insolação e temperatura, registando-se ainda, com alguma frequência, a ocorrência de vários episódios climáticos extremos: cheias e secas. A amplitude térmica é muito acentuada; a temperatura média anual é de cerca de 16°C, com a máxima a atingir valores superiores a 40°C e a mínima a situar-se abaixo de 0°C no Inverno (<http://www.merturis.pt/>: Merturis, acedido em 09/09/2011).

6.2. Amostragem

Da amostragem fazem parte solos na zona de influência da Mina de São Domingos, bem como amostras de vegetação endémica: urze (*E. andevalensis*) e esteva (*C. ladanifer*).

Foram recolhidas amostras em seis locais distintos: cinco locais de amostragem situam-se na Mina de São Domingos (L1 a L5) (Fig. 7) e um sexto local de amostragem foi escolhido numa área não contaminada (L6), situada a cerca de 28 km da Mina de São Domingos. Em cada uma das áreas delimitaram-se parcelas de 20x20 metros. A amostragem dos solos foi realizada em cada uma das parcelas sendo colhidas amostras composta de solo superficial (camada 0-20 cm). Em cada local de amostragem procedeu-se à abertura de uma cova à profundidade de, aproximadamente, 20 cm. Com a ajuda de uma pá, retirou-se da parede da cova uma fatia de terra de espessura de 15-25 mm. Após a recolha das amostras parciais, efectua-se a sua mistura e conveniente homogeneização de modo a obter uma amostra composta representativa de cada local. Da amostra composta, depois de bem homogeneizada, recolheram-se cerca de 6 kg de terra, que foram acondicionados em sacos de plástico, devidamente rotulados, e transportados para o laboratório.

Nas páginas seguintes será feita uma breve descrição de cada local de amostragem.

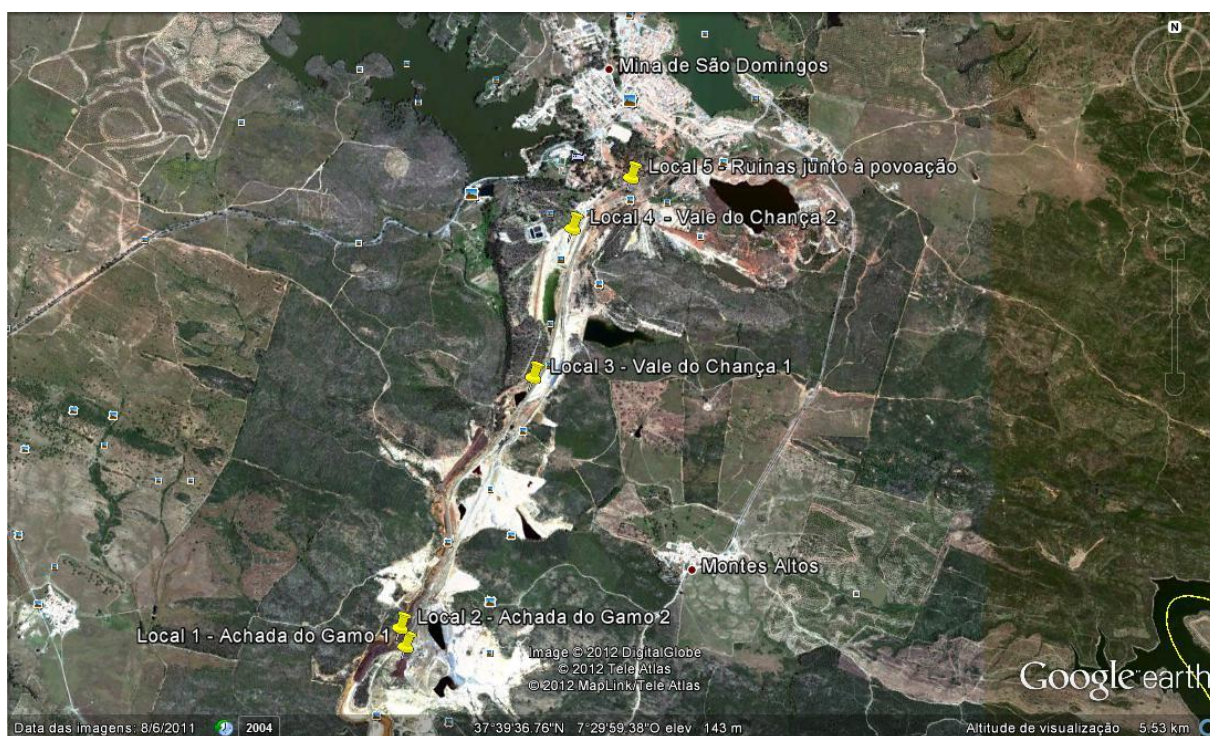


Figura 7. Mapa da área mineira de São Domingos com a localização dos pontos de amostragem (solo e plantas) (imagem tratada a partir de uma imagem do *Google Earth*).

L1

A amostra 1 foi recolhida no local com as coordenadas 37° 38' 49,58" N e 07° 30' 44,42" O, a uma altitude de 176 m (Fig. 8). Foram recolhidas amostras de solo, de *E. andevalensis* e de *C. ladanifer*.

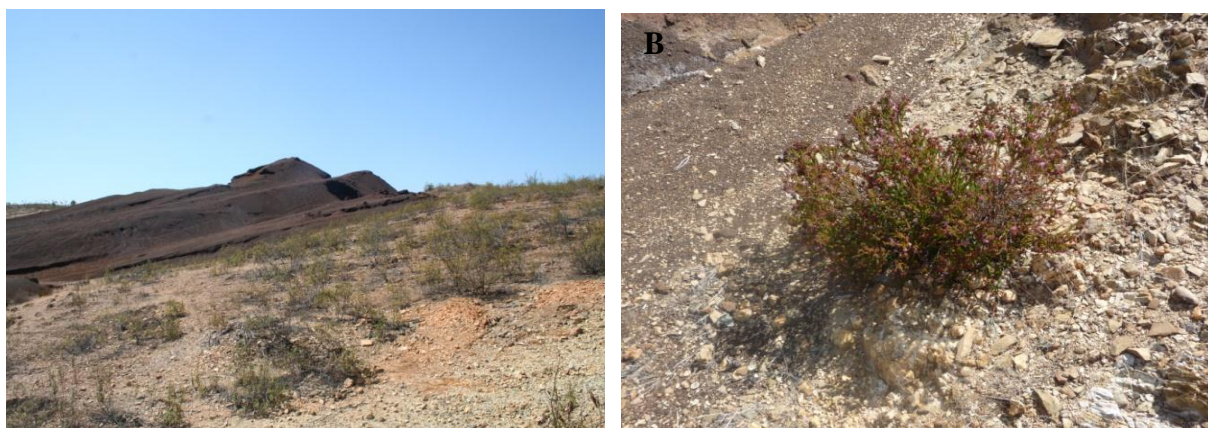


Figura 8. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) Vista geral do local de amostragem 1, e (B) vista detalhada do local de amostragem da planta *E. andevalensis*.

L2

A amostra 2 foi recolhida no local com as coordenadas 37° 38' 52,72" N e 07° 30' 45,54" O, a uma altitude de 176 m (Fig. 9). Foram recolhidas amostras de solo, de *E. andevalensis* e de *C. ladanifer*.

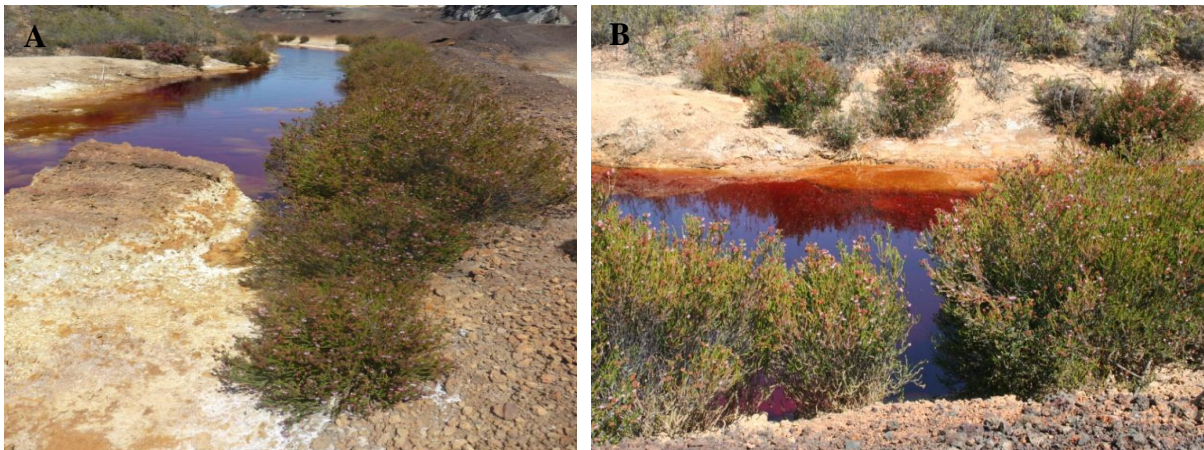


Figura 9. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) Vista geral do local de amostragem 2, e (B) vista detalhada do local de amostragem das plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer*.

L3

A amostra 3 foi recolhida no local com as coordenadas 37° 39' 34,52" N e 07° 30' 17,45" O, a uma altitude de 168 m (Fig. 10). Foram recolhidas amostras de solo e ambas as plantas utilizadas no estudo.

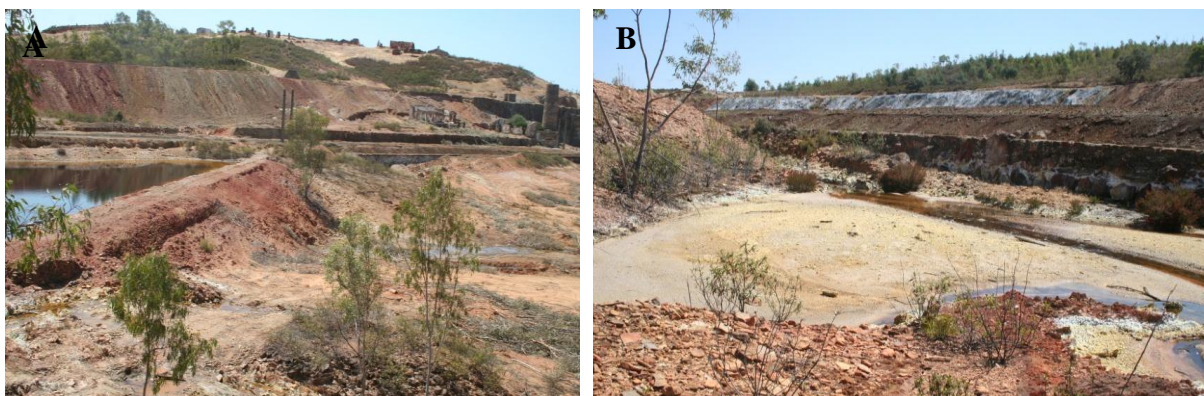


Figura 10. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) e (B) vista geral do ponto de amostragem 3.

L4

A amostra 4 foi recolhida no local com as coordenadas 37° 39' 59,30" N e 07° 30' 09,19" O, a uma altitude de 185 m (Fig. 11). Foram recolhidas amostras de solo e de *C. ladanifer*. Neste local não foi possível efetuar a amostragem de *E. andevalensis*, tendo sido necessário sair um pouco do local de amostragem para poder amostrar esta planta. Nesse sentido, a amostra de *E. andevalensis* utilizada não é representativa deste local de amostragem.

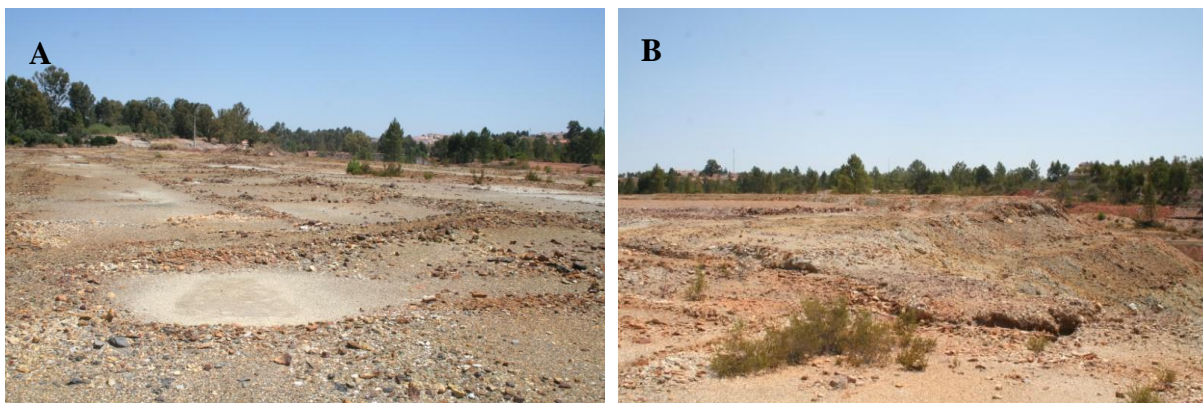


Figura 11. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) e (B) vista geral do local de amostragem 4.

L5

A amostra 5 foi recolhida no local com as coordenadas 37° 40' 07,63" N e 07° 29' 56,88" O, a uma altitude de 182 m (Fig. 12). Este é um local já muito próximo da população de Mina de São Domingos. Foram recolhidas amostras de solo e amostras de ambas as plantas. Neste local de amostragem era evidente a existência de outras espécies de plantas, nomeadamente árvores



Figura 12. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Mina de São Domingos. (A) e (B) vista geral do local de amostragem 5.

L6

A amostra 6 foi recolhida no local com as coordenadas 37° 42' 52,91" N e 07° 42' 32,14" O, a uma altitude de 188 m (Fig. 13). Foram recolhidas amostras de solo e de *C. ladanifer*. Neste local não foi possível encontrar a planta *E. andevalensis*, muito difícil de encontrar em locais afastados da Mina de São Domingos.

Esta amostra neste estudo desempenha o papel de “amostra de referência”, por ter sido recolhida num local isento de contaminação por metais.



Figura 13. Zona de amostragem dos solos e plantas utilizados no estudo: Corte Gafo de Cima. (A) e (B) vista geral do local de amostragem 6.

6.3. Secagem do solo ao ar

Após a chegada ao laboratório, uma parte da amostra foi conservada “à humidade de campo”, a 4°C, para posterior utilização na caracterização das actividades ecotoxicológicas dos solos. A restante amostra foi colocada a secar ao ar.

A secagem ao ar torna-se necessária porque as amostras, muitas vezes, chegam ao laboratório com teores de humidade demasiado elevados para permitir que a amostra possa ser convenientemente manuseada nas operações subsequentes.

Uma vez chegadas ao laboratório, as amostras foram secas, expondo a terra ao ar, em tabuleiros, à temperatura ambiente, durante um período de tempo suficiente até as amostras apresentarem um aspeto seco. Durante o período de secagem teve-se o cuidado de ir desfazendo os agregados de modo a facilitar as operações subsequentes.

6.4. Crivagem e determinação da % da fração fina

É na fração fina do solo que reside a quase totalidade das suas características que nos permitem avaliar a qualidade desse solo, tanto em termos da sua fertilidade como em termos do seu grau de contaminação ou de poluição (Alvarenga, 2010). Deste modo, a crivagem foi feita através de um crivo de malha 2 mm. A fração retida na parte superior do crivo, constituída por partículas de diâmetro superior a 2 mm, é designada por elementos grosseiros. A fração que atravessa o crivo, constituída por partículas de diâmetro inferior a 2 mm, é a chamada fração fina do solo.

Após a secagem, crivagem e determinação da % da fração fina, as amostras para utilizar na caracterização físico-química dos solos foram guardadas em frascos estanques, ao abrigo da luz, devidamente etiquetados (± 300 g) e as amostras relativas aos ensaios ecotoxicológicos foram guardadas em sacos de plástico escuro, em local fresco e seco.

6.5. Análises físico-químicas de solos

6.5.1. Determinação da humidade residual

A humidade residual, ou % de matéria seca, foi determinada nas amostras de solo secas ao ar, secando, separadamente, uma porção de 1 g de cada amostra a 105°C, até peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Todos os resultados das outras análises devem ser reportados à amostra isenta de humidade.

A % de matéria seca existente nas amostras de solos analisados foi obtida através da seguinte expressão:

$$\% \text{ matéria seca} = \frac{\text{massa de amostra seca}}{\text{massa de amostra húmida}} \times 100 = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \text{ (g amostra seca/100 g amostra)}$$

Onde:

m_1 – peso do cadinho vazio (g);

m_2 – peso do cadinho com amostra húmida (g);

m_3 – peso do cadinho com amostra seca a 100-105°C.

6.5.2. Determinação do pH (H₂O)

A determinação do pH (H₂O) permite efetuar a avaliação da acidez real de um solo. A determinação do pH (H₂O) é efetuada numa suspensão de solo em água, numa proporção solo:água destilada de 1:2,5 em peso, a 20°C (Quelhas dos Santos, 1996). Pesou-se uma amostra de 20 g de terra fina seca ao ar de cada local, para um copo de medição de pH e adicionou-se 50 ml de água destilada. Agitou-se a intervalos regulares, durante 1 hora, com a ajuda de uma vareta de vidro, e deixou-se repousar cerca de 30 minutos, até o material sólido sedimentar. Os ensaios foram realizados em triplicado. As medições foram efectuadas por potenciometria direta utilizando um aparelho medidor de pH (Metrohm 654 pH-Meter) equipado com um eléctrodo de vidro combinado e calibrado com padrões de pH 7,0 e 4,0.

Segundo Quelhas dos Santos (1996), a classificação dos solos quanto à reação, ou seja pH (H₂O) pode ser feita de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2. Classificação dos solos quanto à reação, ou seja pH(H₂O).

| pH (H ₂ O) | Designação do solo |
|-----------------------|--------------------|
| < 4,5 | Muito ácido |
| 4,6 a 5,5 | Ácido |
| 5,6 a 6,5 | Pouco ácido |
| 6,6 a 7,5 | Neutro |
| 7,6 a 8,5 | Pouco alcalino |
| 8,6 a 9,5 | Alcalino |
| > 9,5 | Muito alcalino |

6.5.3. Determinação da condutividade elétrica

A medida da condutividade elétrica (CE) de uma suspensão solo:água destilada pode ser assumida como uma medida indireta da salinidade do solo. De facto, embora esta devesse ser medida no extrato de saturação do solo, avalia-se, de modo muito mais cómodo, através da medição da condutividade elétrica (expressa normalmente em mS/cm) em suspensões solo em água destilada de 1:5 (Quelhas dos Santos, 1996).

Para efetuar esta medição, pesou-se uma amostra de 20 g de terra fina seca ao ar para um copo de 200 ml de capacidade e adicionou-se 100 ml de água destilada. Agitou-se a intervalos regulares durante 1 hora, com a ajuda de uma vareta de vidro, e deixou-se repousar cerca de 30 minutos. A condutividade elétrica foi medida no líquido sobrenadante, utilizando um condutímetro (Metrohm 660 Conductometer). Os ensaios foram realizados em triplicado.

6.5.4. Determinação do teor em matéria orgânica

Para a determinação da matéria orgânica (MO) nos solos utilizou-se o método de oxidação por via húmida, habitualmente conhecido como método de Walkley & Black, que permite determinar o carbono orgânico total. O método baseia-se na oxidação em meio ácido da MO existente no solo por um excesso de dicromato de potássio, e na titulação do excesso com sulfato ferroso amoniacal (sal de Mohr). A MO calcula-se multiplicando o teor em carbono orgânico total pelo factor 1,724, partindo do pressuposto que a matéria orgânica do solo é constituída por 58% de carbono (Alvarenga, 2010).

Pesou-se 0,5 g de amostra de terra fina seca ao ar. Colocou-se a amostra num erlenmeyer de 500 ml e adicionou-se 5 ml da solução de dicromato de potássio 1 N e 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (98% p/p e $d = 1,19$). Misturou-se, mediante agitação suave, para evitar que o solo aderisse às paredes do balão. Deixou-se em repouso durante 30 minutos. Diluiu-se com 100 ml de água destilada, juntou-se 5 ml de ácido fosfórico concentrado (98% p/p e $d = 1,83$), 0,1 g de fluoreto de sódio e 1 ml de difenilamina. Titulou-se com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,5 N até obter uma cor verde.

Preparou-se, paralelamente, um branco exatamente da mesma maneira que se fez para a amostra e titulou-se, também, com o sal de Mohr. Foram realizadas três réplicas de cada amostra e duas réplicas do branco.

$$\% \text{ Carbono orgânico (g Carbono orgânico/100 g amostra)} = \frac{(B - V) \times T \times 0,3}{m}$$

Onde:

B = média dos volumes (ml) de sulfato ferroso amoniacal gastos na titulação dos ensaios em branco;

V = média dos volumes (ml) de sulfato ferroso amoniacal gastos na titulação da amostra;

T = título do sulfato ferroso amoniacal (neste caso 0,5 N);

m = massa de amostra de solo (g).

$$\% \text{ Matéria orgânica (g matéria orgânica/100 g amostra)} = \% \text{ Carbono orgânico} \times 1,72$$

A classificação dos solos quanto ao teor em matéria orgânica pode ser feita de acordo com a escala proposta em Quelhas dos Santos (1996) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos solos quanto ao teor em matéria orgânica.

| <i>% matéria orgânica Solos ligeiros</i> | <i>% matéria orgânica Solos médios e pesados</i> | <i>Classificação</i> |
|--|--|----------------------|
| < 0,5 | <1,0 | Muito Baixo |
| 0,6 – 1,5 | 1,1-2,0 | Baixo |
| 1,6 – 5,0 | 2,1-7,0 | Médio |
| 5,1 – 10,0 | 7,1-15,0 | Alto |
| >10,0 | >15,0 | Muito Alto |

6.5.5. Capacidade de troca catiónica

A Capacidade de Troca Catiónica (CTC), mede a totalidade de catiões que um solo pode adsorver ou trocar a determinado pH, e é expressa em miliequivalentes por 100 g de terra fina, de H⁺ ou o seu equivalente noutros iões, isto é, é igual à carga negativa total das partículas de argila e húmus (Alvarenga, 2010).

O método utilizado na determinação da CTC neste estudo foi o método do acetato de amónio a pH 7, conforme descrito em Alvarenga (2010). Neste método, os catiões do solo são substituídos pelos iões amónio de uma solução que percola através do solo, sendo, depois, os iões amónio permutados pelos catiões de uma outra solução percolante, permitindo a sua quantificação. Uma amostra de solo (5 g) é percolada com um excesso de solução de acetato de amónio 1 N a pH 7, de maneira que a máxima troca ocorra num espaço de poucos minutos. O excesso de amónio é lavado com 100 ml de etanol a 96%, sendo o amónio adsorvido permutado pelo potássio, por percolação com 100 ml de KCl 1N, acidificado (Alvarenga, 2010).

Para a determinação da capacidade de troca, foram medidos 25 ml do percolado anterior para o tubo do aparelho Kjeltex, alcalinizados com 5 ml da solução de NaOH a 35%, tendo o amoníaco formado sido destilado por arrastamento em corrente de vapor (destilador Büchi Distillation Unit, B-316). O destilado foi recebido num balão erlenmeyer de 100 ml contendo 10 ml de ácido bórico a 2%, a que se adicionaram previamente 6 gotas de indicador

de Tashiro. O destilado foi titulado com a solução de HCl 0,01 N até a cor virar de verde para violeta. Foram realizadas três réplicas por amostra de solo e três réplicas do ensaio em branco.

A CTC de um solo corresponde ao número de miliequivalentes de amónio fixados, em substituição dos catiões de troca, expresso em (meq/100 g), podendo ser calculada através da seguinte expressão:

$$CTC \text{ (meq/100 g)} = \frac{(V - EB) \times 100}{m \times v}$$

Em que :

V – volume de HCl 0,01 N gasto a titular a parte alíquota do balão B (ml);

EB – volume de HCl 0,01 N gasto para titular um volume de ensaio em branco, igual ao volume da parte alíquota do balão B (ml);

v – parte alíquota do balão B tomada para destilação (ml);

m – massa de terra fina seca a 100 – 105°C.

6.5.6. Determinação do teor em fósforo e potássio “assimiláveis”

Extração simultânea do fósforo e do potássio por meio de uma solução de lactato de amónio e ácido acético, tamponizada a pH compreendido entre 3,65 e 3,75, após agitação constante durante duas horas e filtração. Doseamento do fósforo e do potássio no extracto obtido. O fósforo pelo método colorimétrico do molibdato ácido-acido ascórbico e o potássio, directamente, por fotometria de chama de emissão. O método foi efectuado de acordo com o descrito em Alvarenga (2011).

Preparação do extrato

O extrato para a determinação do fósforo e o potássio foi preparado pesando uma amostra de 2 g de terra para um erlenmeyer de 125 ml, à qual foram adicionados 40 ml da **solução extrativa de ensaio** (solução de lactato de amónio 0,1 M e ácido acético 0,4 M, tamponizada a pH compreendido entre 3,65 e 3,75). A suspensão foi agitada durante 2 h, num agitador de “vai-vem” (Stuart Reciprocating Shaker SSL2) a velocidade constante. Em seguida, filtrou-se por um filtro Whatman nº40, desprezando as primeiras porções de filtrado. Foram realizadas três réplicas por amostra e dois ensaios em branco.

Determinação do fósforo “assimilável”

Mediram-se 5 ml do filtrado, ou uma sua diluição, para tubos de ensaio de 50 ml, efetuando também um ensaio em branco com 5 ml da solução extrativa de ensaio. Adicionou-se 20 ml de solução de ensaio (solução de água destilada com molibdato de amônio em meio ácido e ácido ascórbico) que faz a coloração da solução. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e deixou-se em repouso durante 10 minutos. A absorvância foi medida a um comprimento de onda de 650 nm, num espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis (Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro). A curva padrão do fósforo foi preparada utilizando padrões com as concentrações de 10; 8; 6; 4 e 2 mg $P_2O_5 l^{-1}$ e um branco preparado com a solução extrativa do ensaio. Pipetou-se 5 ml de cada uma destas soluções padrão para tubos, adicionou-se 20 ml da solução de coloração mencionada anteriormente e deixou-se em repouso durante 10 minutos. A absorvância foi medida a um comprimento de onda de 650 nm.

Determinação do potássio “assimilável”

O extrato obtido foi lido diretamente num fotômetro de chama de emissão CORNING Flame Photometer 410. O zero de emissão do aparelho foi acertado com a solução extrativa de ensaio e o valor de 10 de intensidade de radiação emitida foi acertado com uma solução de 10 ppm de K_2O . A curva padrão de potássio foi obtida preparando padrões com as concentrações de: 1; 2, 3, 4 e 10 mg $K_2O l^{-1}$, cuja intensidade de radiação emitida lida no fotômetro permitiu a determinação da concentração de K “assimilável” nas amostras.

6.5.7. Determinação do azoto total (Kjeldahl)

O método utilizado no doseamento do azoto total (orgânico e amoniacal, não inclui nitritos e nitratos) é o chamado método de Kjeldahl. Este baseia-se na mineralização dos compostos orgânicos contidos na amostra em meio ácido, a quente e na presença de um catalisador metálico. Essa digestão leva à conversão de todo o azoto em ião amônio, que é posteriormente convertido em amoníaco, destilado em corrente de vapor e recolhido numa solução de ácido bórico, onde é doseado por titulação com uma solução de HCl de título conhecido (Alvarenga, 2011a).

Este processo decorre em 3 processos: mineralização, destilação e titulação, tendo sido efectuado de acordo com Alvarenga (2011a).

1º Mineralização

Pesou-se cerca de 5 g de amostra de terra fina seca ao ar em papel de filtro. Embrulhou-se e colocou-se em tubo de mineralização de 250 ml. Preparam-se 2 réplicas por amostra e um branco com um papel de filtro. Adicionou-se regularizador de ebulição, 5 g de mistura catalisadora (mistura de sulfato de cobre e sulfato de potássio) e 30 ml de ácido sulfúrico concentrado (98% p/p e $d = 1,19$). A digestão das amostras foi efetuada em manta de aquecimento (Selecta Bolc Digest 6, acoplada a um programador de ciclos de aquecimento Selecta RAT 2) durante cerca de 2 h.

Após arrefecimento, transferiu-se o conteúdo dos tubos de digestão para balões volumétricos de 250 ml e completou-se o volume com água destilada.

2º Destilação

Pipetou-se 50 ml de amostra digerida contida nos balões volumétricos para um tubo de destilação do aparelho de Kjeltex (Büchi Distillation Unit B-316). Colocou-se o tubo de mineralização no destilador do aparelho de Kjeltex e adicionou-se ao tubo cerca de 100 ml de NaOH a 32% (p/v). O amoníaco formado foi destilado em corrente de vapor e recolhido num erlenmeyer com 50 ml de ácido bórico a 4% e 4 gotas de indicador de Tashiro.

3º Titulação

Titulou-se a solução de destilado obtida com solução de HCl 0,05 N até viragem do indicador de verde para violeta.

O azoto total da amostra foi calculado através da seguinte expressão:

$$\% \text{ N (g N/100 g de amostra)} = \frac{1,4 \times [\text{HCl}] \times (V_A - V_B)}{m} \times \frac{V (\text{balão volumétrico})}{V (\text{pipetado para destilação})}$$

Onde:

[HCl] = concentração exacta da solução de HCl, em Normalidade ou Molaridade;

V_A = volume da solução de HCl, em ml, gasto na titulação da amostra;

V_B = volume da solução de HCl, em ml, gasto na titulação do ensaio em branco;

m = massa da amostra mineralizada, em gramas.

6.5.8. Doseamento dos metais totais – Digestão com água régia

A metodologia selecionada para a determinação do teor em metais totais neste estudo foi a da digestão com água régia (do latim "*aqua regia*" que significa "água real"), que consiste numa mistura de ácido clorídrico com ácido nítrico numa razão 1:3 v/v. Esta é a metodologia que se encontra no procedimento recomendado pela *International Organization for Standardization* (ISO 11466,1995).

Amostras de 2,5 g de fração fina do solo seco ao ar foram digeridas com 28 ml de uma mistura de HCl concentrado (37%, $d = 1,19$) com HNO₃ concentrado (70%, $d = 1,3$), numa proporção de 3:1 v/v (água régia), à temperatura ambiente, durante 16 h. Logo após, a suspensão é digerida a 130°C, durante 2 h, em condições de refluxo. A suspensão obtida, após arrefecimento, é filtrada por um filtro isento de cinzas Whatman nº40, diluída para 100 ml com HNO₃ 0,5 M, e armazenada em frascos de polietileno a 4°C para análise elementar por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama (Varian Spectra AA 220FS) ou com atomização eletrotérmica (Varian Spectra AA 220Z). As condições analíticas utilizadas para a determinação de cada metal ou metalóide (As, Cu, Pb e Zn) foram as implementadas no laboratório de Absorção Atómica da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja (Alvarenga, 2011b)

Foram preparadas três réplicas por cada amostra de solo analisado e um branco por cada grupo de amostras.

6.5.8.1. Avaliação da biodisponibilidade dos metais utilizando métodos químicos

Os metais extraídos por determinada solução extratante e associados aos locais de permuta iónica, são aqueles que se assume serem mais facilmente mobilizáveis pelas reações de permuta de iões entre o solo e a solução do solo e, por esse facto, estão disponíveis para os organismos. Os metais associados a fases mais oxidáveis, medidos por agentes extratantes mais agressivos, persistem no solo por períodos mais longos, mas podem ser mobilizados por processos de decomposição (*e.g.* por ação de agentes erosivos ou devido à ação microbiana) (Alvarenga, 2009).

Gupta *et al.* (1996) distinguem estas duas frações em que os metais podem existir no solo, em “móveis” e “mobilizáveis”, considerando como característica destas frações o facto de o metal numa fração móvel se encontrar “efetivamente biodisponível” e lixiviável,

enquanto que numa fração mobilizável o metal apenas se encontrar “potencialmente biodisponível”.

A fração “móvel” de um metal diz respeito não apenas à atividade do íão livre na solução do solo mas, também, à fração desse íão que se encontra adsorvida aos colóides organo-minerais no solo, em equilíbrio com a solução do solo. Essa fração, dita “móvel” ou “efetivamente biodisponível”, pode ser facilmente extraída com recurso a soluções extratantes neutras de sais, não tamponizadas, como por exemplo NaNO_3 , CaCl_2 ou NH_4NO_3 (Gupta *et al.*, 1996).

Neste trabalho foram efetuadas duas extrações de passo único com o objetivo de quantificar o teor em metal existente nas duas fracções mencionadas: metal na fração “móvel”, biodisponibilidade efetiva, e metal na fração “mobilizável”, biodisponibilidade potencial. Em ambos os casos a análise dos metais e/ou metalóides foi feita por espectrofotometria de absorção atômica com atomização por chama (Varian Spectra AA 220FS) ou com atomização eletrotérmica (Varian Spectra AA 220Z).

6.5.8.2. Biodisponibilidade efetiva

Uma solução de cloreto de cálcio 0,01 M, pH não tamponizado simula a extração da fração de metais efectivamente biodisponíveis (fração móvel desses metais) conforme utilizado por outros autores (Conder e Lanno, 2000; Hodson *et al.*, 2001; Pueyo *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2009): 10 g de amostra de solo foram agitados com 100 ml de uma solução de CaCl_2 0,01M, num agitador de “vai-vem” (Stuart Reciprocating Shaker SSL2), durante 2 h, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Depois de terminada a extração foi efectuada a filtração do sobrenadante obtido através de filtro Whatman nº 40. As amostras foram acidificadas com 0,1 ml de HNO_3 concentrado (65% e $d=1,3$) e armazenadas em frascos de polietileno a 4°C para análise elementar. Foram realizadas três réplicas por cada amostra de solo e um branco por cada grupo de amostras.

6.5.8.3. Biodisponibilidade potencial

A solução obtida pela mistura de acetato de amónio 0,5 M, ácido acético 0,5 M e 0,01 M EDTA, pH 4,7 simula a extração da fração de metais potencialmente biodisponíveis (fração mobilizável desses metais). Esta solução é referida por Hammer e Keller (2002) como tendo sido inicialmente desenvolvida para uso em solos ácidos, como é o caso. A sua capacidade

extratante baseia-se na acção combinada do acetato de amónio e do EDTA, em que o catião amónio se permuta com os metais adsorvidos, atuando o EDTA como agente quelante, formando complexos estáveis com muitos dos iões metálicos, o que previne a sua precipitação secundária, como fosfatos, durante o processo de extração (Alvarenga, 2009).

O procedimento utilizado neste caso foi semelhante ao anterior: 10 g de solo foram agitados com 100 ml de uma solução extratante de EDTA 0,02 M, tamponizada a pH 4,65, com acetato de amónio 0,5 M e com ácido acético 0,5 M, num agitador de “vai-vem” (Stuart Reciprocating Shaker SSL2), durante 2 h, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Depois de terminada a extração foi efetuada a filtração do sobrenadante obtido através de filtro Whatman nº 40 e a acidificação com 0,1 ml de HNO_3 concentrada e armazenada em frascos de polietileno a 4°C para análise elementar. Foram realizadas três réplicas por cada amostra de solo e um branco por cada grupo de amostras.

6.6. Ensaios ecotoxicológicos

Neste trabalho, foram utilizados diferentes ensaios ecotoxicológicos de exposição direta para avaliação da função habitat do solo: mortalidade e reprodução com *E. fetida* e germinação de sementes de *L. sativa*. Os ensaios foram efetuados diretamente no solo a testar (100%), ou numa diluição deste solo teste com solo artificial (75, 50 e 25% p/p) preparado de acordo com a norma OECD (OECD 207, 1984) (10% p/p de turfa de estagno moída, 70% p/p de areia de quartzo, 20% p/p de argila de caulino e 1% p/p de carbonato de cálcio em pó para ajustar o pH a 6,5. Este solo artificial foi utilizado, nos ensaios ecotoxicológicos, como o solo controlo (0%).

Sempre que possível, foi calculado algum dos seguintes parâmetros ecotoxicológicos:

- EC_{50} : concentração para a qual se verifica 50% de redução no parâmetro em análise, seja ele, por exemplo, sobrevivência, número de juvenis, número de sementes germinadas, etc.;
- NOEC – Concentração máxima para a qual ainda não se observa um efeito tóxico significativo (do inglês “*No observable effect concentration*”);
- LOEC – Concentração mínima para a qual já se observa um efeito tóxico significativo (do inglês “*Lowest observable effect concentration*”).

6.6.1. Ensaio de mortalidade com *Eisenia fetida*

O ensaio de toxicidade aguda utilizando a minhoca *E. fetida* foi conduzido de acordo com a norma OECD (OECD 207, 1984). Para cada solo a testar, colocaram-se 400 g de solo, ou de uma sua diluição com solo artificial (25, 50 e 75%, p/p), em caixas plásticas fechadas (2 l de capacidade, área 200 cm², que proporciona uma altura de solo húmido de 5-6 cm), perfuradas na tampa por forma a permitir trocas gasosas com o exterior. O solo artificial foi utilizado como controlo negativo (0%), tendo-se preparado quatro repetições de cada ensaio, à exceção do solo 5, em que só se prepararam três réplicas de cada concentração. As misturas foram colocadas a 65% da sua capacidade de retenção de água, por adição de água destilada, 24 h antes do início do ensaio. Decorridas 24 h após a preparação das misturas, introduziram-se dez minhocas em cada uma das caixas. As minhocas foram selecionadas de culturas mantidas em laboratório, tendo-se o cuidado de usar apenas organismos adultos, com clitélio bem identificado, pesando entre 0,2 e 0,4 g. Os testes foram conduzidos em câmara de ambiente controlado (Fitoclima S 600 da Aralab), a 20 ± 2°C, utilizando iluminação contínua.

A mortalidade dos organismos foi registada ao fim de 14 dias de exposição.

6.6.2. Ensaio de reprodução usando *E. fetida*

Minhocas adultas são expostas a um intervalo de concentrações do solo teste. O intervalo de concentrações é escolhido de forma a utilizar valores que possam causar efeitos subletais num período de exposição de quatro semanas. Após esse período de exposição, os adultos serão então removidos do solo e os efeitos na reprodução são verificados, após mais quatro semanas, por contagem dos juvenis presentes no solo.

O ensaio crónico de reprodução utilizando a minhoca *E. fetida* foi conduzido de acordo com a norma OECD (OECD 222, 2004). Para cada solo a testar, colocaram-se 400 g de solo, ou de uma sua diluição com solo artificial (25, 50 e 75%, p/p), em caixas plásticas fechadas (2 l de capacidade, área 200 cm², que proporciona uma altura de solo húmido de 5-6 cm), perfuradas na tampa por forma a permitir trocas gasosas com o exterior. O solo artificial foi utilizado como controlo negativo (0%), tendo-se preparado quatro repetições de cada ensaio, à exceção do solo 5, em que só se prepararam três réplicas de cada concentração. As misturas foram colocadas a 65% da sua capacidade de retenção de água, por adição de água destilada, 24 h antes do início do ensaio. Decorridas 24 h após a preparação das misturas, introduziram-se dez minhocas em cada uma das caixas. As minhocas foram selecionadas de

culturas mantidas em laboratório, tendo-se o cuidado de usar apenas organismos adultos, com clitélia bem identificado, pesando entre 0,2 e 0,4 g. Os testes foram conduzidos em câmara de ambiente controlado (Fitoclima S 600 da Aralab), a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando um fotoperíodo de 16 h dia e 8 h noite, com adição de 5 g de substrato (estrupe bovino moído) uma vez por semana, durante 28 dias.

Ao fim dos 28 dias, as minhocas vivas foram retiradas do solo, contadas e pesadas. Os recipientes foram colocados de seguida a incubar durante mais quatro semanas. No final do teste, o número de juvenis é contado. Sempre que possível, calcularam-se os valores de NOEC e de LOEC.

6.6.3. Ensaio de germinação com *Lactuca sativa* L.

Os ensaios de germinação foram executados de acordo com o protocolo descrito pela Norma ISO/DIS 17126 (2004), utilizando sementes de alface (*L. sativa*). Foram utilizadas 400 g de solo, ou diluições deste com solo artificial (25, 50 e 75% v/v), em caixas de plástico transparente quadradas (10 cm \times 10 cm de base). O solo artificial foi utilizado como controlo negativo (0%), tendo-se preparado quatro repetições de cada ensaio. Os solos foram colocados a 70% da sua capacidade de retenção de água.

Foram colocadas 40 sementes da espécie testada em cada caixa, tendo-se distribuído as sementes de forma homogénea sobre a superfície do solo. De seguida, foi colocada sobre esta superfície uma camada fina de areia seca.

As placas foram incubadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com um fotoperíodo de 16 h dia e 8 h noite durante 120 h (5 dias). Durante as primeiras 48 h, esta incubação foi feita no escuro, mantendo, para isso, as placas de Petri num tabuleiro dentro de um saco de polietileno preto. Passadas 48 h, o saco é retirado e as placas de Petri são novamente colocadas a incubar nas condições do ensaio.

Ao fim de 120 h, registou-se o número de sementes germinadas em cada caixa. Sempre que possível, calcularam-se os valores de EC_{50} .

6.6.4. Determinação dos metais acumulados nas minhocas (bioacumulação)

No final das primeiras quatro semanas do ensaio de reprodução descrito anteriormente, as minhocas foram lavadas, pesadas e colocadas em caixas plásticas tapadas, forradas com tiras de papel absorvente embebidas em água de Mili-Q, de modo a permitir a sua depuração.

Apos a depuração, as minhocas foram novamente lavadas, pesadas, colocadas em tubos de centrífuga e congeladas durante 4 horas para as anestesiarem antes da sua digestão.

Antes da sua digestão, as minhocas foram transferidas para um cadinho de porcelana e secas em estufa (Memmer UNE 400) a 105°C até peso constante, de modo a que o teor em metais pudesse ser reportado ao seu peso seco.

O protocolo de digestão utilizado foi adaptado de Conder *et al.* (2002). A digestão foi efetuada com 10 ml de HNO₃ conc. (65% p/p, d=1,43). A mistura foi deixada em contacto durante 18 horas a 25°C, após o que se aqueceu em banho-maria de argolas (Selecta Precistern) até evaporação completa do ácido. De seguida foi efetuada uma redissolução usando 10 ml de HNO₃ 0,5 M. Deixou-se arrefecer e filtrou-se através um filtro Whatman nº 40. O volume foi completado com HNO₃ 0,5 M e armazenado em frascos de polietileno a 4°C para análise elementar. Foram realizadas quatro réplicas por cada amostra de solo e um ensaio em branco por cada grupo de amostras.

A análise dos metais e/ou metalóides foi feita por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama (Varian Spectra AA 220FS) ou com atomização eletrotérmica (Varian Spectra AA 220Z).

6.7. Ensaio enzimáticos

A avaliação da qualidade dos solos foi também efetuada recorrendo à determinação da atividade de algumas enzimas do solo (*e.g.* β-glucosidase, fosfatases ácidas, urease e desidrogenase). A determinação das atividades enzimáticas foi feita em amostras de solo à “humidade de campo”, conservadas a 4°C desde a amostragem até à sua análise. Todas as amostras analisadas foram crivadas por crivo de malha 2 mm. Foi determinada a humidade residual destas amostras de solo, utilizando a mesma metodologia que a utilizada para as amostras secas ao ar, e a respetiva atividade enzimática foi reportada à matéria seca.

A determinação da atividade enzimática da desidrogenase foi efectuada de imediato, sem ter submetido o solo a qualquer tipo de conservação.

6.7.1. β-Glucosidase

A β-glucosidase está envolvida no passo final da degradação da celulose, catalisando a hidrólise de carboidratos com ligações β-D-glucósido, como a celobiose, proporcionando substratos energéticos para os microrganismos heterotróficos do solo. O método utilizado

baseia-se na determinação do *p*-nitrofenol libertado após a incubação do solo com o substrato *p*-nitrofenil-d-glucopiranosídeo, durante 1 h a 37°C (Tabatabai, 1982; Eivazi e Tabatabai, 1988; Alef e Nannipieri, 1995; Alvarenga, 2009). O produto da reação é determinado espectrofotometricamente a 400 nm (espectrofotómetro UV-Vis Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

6.7.2. Fosfatases ácidas

Método baseado na determinação do *p*-nitrofenol libertado após a incubação do solo com o substrato *p*-nitrofenilfosfato (PNP ác.) durante 1 h a 37°C (Tabatabai e Bremner, 1969; Eivazi e Tabatabai, 1977; Alef *et al.*, 1995; Alvarenga, 2009). O produto da reação é determinado espectrofotometricamente a 400 nm (espectrofotómetro UV-Vis Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

6.7.3. Urease

Método baseado na determinação do azoto amoniacal libertado após a incubação do solo com o substrato ureia durante 2 h a 37°C (Kandeler e Gerber, 1988; Alef e Nannipieri, 1995a; Alvarenga, 2009). O produto da reação é determinado espectrofotometricamente a 690 nm (espectrofotómetro UV-Vis Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro).

6.7.4. Desidrogenase

O procedimento analítico de determinação da atividade enzimática da desidrogenase baseia-se na redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) a trifenilformazan (TPF), uma vez que, na ausência de oxigénio, o TTC atua como aceitador final de eletrões. A solução de TTC é adicionada à amostra de solo, sendo a mistura incubada a 25°C durante 16 h. O TPF libertado é extraído com acetona e determinado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 546 nm (espectrofotómetro UV-Vis Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro) (Chander e Brookes, 1991; Tabatabai, 1994; ISO 23753-1, 2002; Alvarenga, 2009).

6.8. Análises às plantas

As plantas recolhidas nos diferentes locais de amostragem, a esteva (*C. ladanifer*) e a urze (*E. andevalensis*) foram lavadas com água corrente abundante e, posteriormente, com água destilada, de modo a retirar as impurezas depositadas à superfície do material foliar. De seguida, procedeu-se à secagem em estufa (Memmert UNG 400) do material vegetal a 60°C durante 48 horas. Após a secagem, foi efetuada a sua moagem. O material foi conservado em sacos de plástico fechados, ao abrigo da humidade e da luz, até à sua análise.

6.8.1. Digestão de amostras de plantas para a determinação dos metais totais

Procedeu-se à mineralização das amostras por via seca e à sua solubilização com ácido, a quente, de acordo com a metodologia descrita por Alvarenga (2011c).

Neste processo, 2 g de material vegetal, preparado de acordo com a descrição anterior, foram mineralizados a 550°C durante 6-8 h. Ao resíduo calcinado foram adicionados 10 ml de HCl 3N. Procedeu-se ao seu aquecimento até evaporação à secura. Este passo foi repetido três vezes. Na terceira vez, deixou-se apenas 10 minutos, não evaporando até à secura. O líquido foi transferido para um balão de 500 ml, onde o seu volume foi completado com água ultrapura, e, de seguida, filtrado através de um filtro Whatman nº40. Foram preparadas três réplicas para cada amostra bem como um ensaio em branco por cada grupo de amostras.

A amostra foi transferida para frascos de polietileno e conservada a 4°C até ao momento da análise. A análise dos metais e/ou metalóides foi feita por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama (Varian Spectra AA 220FS) ou com atomização electrotérmica (Varian Spectra AA 220Z).

6.9. Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram sujeitos a análise de variância a uma via (ANOVA), tendo-se adoptado o teste *post-hoc* Tuckey HSD na separação das médias. Foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre os teores em As, Cu e Zn nas folhas de *E. andevalensis* e *C. ladanifer*, e os repetivos teores no solo nas diferentes frações. Foram utilizados três níveis de significância; $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$. O mesmo tipo de tratamento foi efetuado entre os teores em As, Cu, Pb e Zn bioacumulados pela *E. fetida* durante os 28 dias de exposição aos solos, e os repetivos teores no solo nas diferentes frações.

Neste caso, os resultados foram analisados para um só nível de significância: $P < 0,05$. O tratamento estatístico dos resultados foi executado com o programa Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2001).

Os valores de NOEC e LOEC foram calculados usando o Teste de Dunnet com o programa Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2001), considerando os resultados encontrados no solo artificial como o “grupo controle”.

Os valores de EC_{50} foram calculados utilizando um modelo de regressão não-linear (*Four Parameter Logistic Curve*) com o software SigmaPlot 10.0 (Systat, Inc., 2001).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi efetuada a caracterização do solo de cinco locais potencialmente contaminados da Mina de São Domingos e de um local não contaminado, a alguns quilómetros da zona contaminada.

Na caracterização dos solos foram utilizados parâmetros físico-químicos, ecotoxicológicos e enzimáticos. Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos nos sub-capítulos seguintes.

7.1. Análises físico-químicas

Todos os solos em análise são constituídos principalmente por elementos grosseiros (Tabela 4). As amostras foram colhidas em solos pouco desenvolvidos, alguns sobre escombrelas antigas, daí que a sua constituição tenha um teor importante de areia grossa.

A fração argilosa é, em todos os solos, bastante baixa (< 10%). Segundo o diagrama para classificação da textura adaptado aos limites internacionais das frações granulométricas, por Gomes e Silva (1962), os solos são de textura média, na sua maioria do tipo franca-arenosa.

Tabela 4. Análise granulométrica dos solos.

| Amostra | Areia Grossa (%) | Areia Fina (%) | Areia (% total) | Limo (%) | Argila (%) | Classe Textural |
|----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|-------------------|------------------------|
| L1 | 40,70 | 43,88 | 84,58 | 9,51 | 4,13 | Arenosa-franca |
| L2 | 39,42 | 42,54 | 81,96 | 12,08 | 4,40 | Franca-arenosa |
| L3 | 41,41 | 31,58 | 72,99 | 22,29 | 4,22 | Franca-arenosa |
| L4 | 39,77 | 36,15 | 75,92 | 18,16 | 4,73 | Franca-arenosa |
| L5 | 51,06 | 22,87 | 73,93 | 17,05 | 8,85 | Franca-arenosa |
| L6 | 68,31 | 16,19 | 84,50 | 11,03 | 5,25 | Arenosa-franca |

Os dados apresentados na Tabela 5. mostram que os valores de pH dos solos amostrados são significativamente diferentes de local para local, segundo a classificação de Quelhas dos Santos (1996), sendo maioritariamente muito ácidos, especialmente nas amostras colhidas nos locais L1 e L4 com $\text{pH}(\text{H}_2\text{O}) = 3$. A amostra colhida no local L5, embora também tenha sido recolhida na Mina de São Domingos, tem um pH perto da neutralidade.

Estes valores refletem a natureza dos materiais sobre os quais os solos tiveram origem e evoluíram, resultando da oxidação dos sulfuretos presentes na mineralização. Ou seja, os solos desenvolvidos sobre escombreliras ou solos sob influência de águas de lixiviação de escombreliras serão mais ácidos que os solos desenvolvidos sobre xistos, porque os primeiros têm a influência dos minerais contidos nas mineralizações, nomeadamente os sulfuretos que acidificam o meio após alteração por oxidação e hidrólise.

Os valores de condutividade elétrica (CE) das amostras de solos analisadas foram mais elevados nos solos dos locais L1, L2, L3 e L4, sendo os valores dos restantes pontos muito mais reduzidos. A CE elevada é uma característica comum em escombrelira com elevadas concentrações de pirite e carbonatos (Nielson e Peterson, 1972). Altos níveis de CE afectam o metabolismo de plantas e/ou a permeabilidade da membrana (Greenway e Munnus, 1980). Por isso, o crescimento da vegetação nestes locais é restringido às plantas que se conseguem adaptar a elevados valores de salinidade do solo, como é o caso da *E. andevalensis* e *C. ladanifer*. Portanto, a salinidade nos escombreliros pode ser uma das principais restrições para o estabelecimento da vegetação, co-adjuvada pela falta de água, falta de nutrientes e, também, por desequilíbrios entre estes, podendo provocar toxicidade iónica específica (Wild, 1993).

O conteúdo em MO dos solos amostrados nos locais L1, L2, L3 e L4 foi bastante baixo, comprometendo o estabelecimento das plantas. Este baixo teor em MO é concomitante com uma acentuada deficiência de nutrientes (Tabela 3), o que é bastante comum em solos afetados por atividades mineiras (Smith e Bradshaw, 1979; Pichtel *et al.*, 1994; Alvarenga, 2009), fazendo com que o estabelecimento das plantas seja difícil. A matéria orgânica não só atua como um reservatório de macronutrientes essenciais, mas, também, fornece um recurso alimentar para invertebrados e microrganismos e, assim, ajuda a reciclagem de nutrientes. Baixa percentagem de matéria orgânica pode levar à lixiviação de nutrientes.

À semelhança do teor em matéria orgânica, os teores de azoto total dos solos dos locais L1, L2, L3 e L4 foram significativamente inferiores aos dos solos dos locais L5 e L6. De facto, o solo colhido no local L5 foi o que apresentou a maior percentagem de N total (0,21%), mais do dobro das restantes amostras.

As amostras onde se determinaram maiores quantidades de fósforo “assimilável” foram as L5 e L6 com 26,2 mg de P_2O_5 kg^{-1} e 17,4 mg P_2O_5 kg^{-1} , respetivamente. De acordo com Quelhas dos Santos (1996), as restantes amostras apresentam um teor de P_2O_5 “assimilável” muito baixo (<25 mg P_2O_5 kg^{-1}). Aliás, também a amostra controlo (local L6) apresenta um teor em fósforo “assimilável” considerado muito baixo, característico dos solos do Baixo Alentejo, em que o baixo teor em matéria orgânica e nutrientes vegetais é comum.

As amostras L5 e L6 apresentam os valores mais elevados de K “assimilável”. Na generalidade das outras amostras ocorrem valores mais baixos, variando entre 10,9 mg kg⁻¹ e 48,9 mg kg⁻¹. Segundo Quelhas dos Santos (1996), as amostras do solo dos locais L1 e L3 apresentam um teor em K₂O baixo (26-50 mg K₂O kg⁻¹), enquanto que as amostras do solo dos locais L2 e L4 apresentam um teor muito baixo (<25 mg K₂O kg⁻¹). A amostra do solo do local L5 apresenta um teor médio (51-100 mg K₂O kg⁻¹), e a amostra do local L6 um teor de K₂O alto (101-200 mg K₂O kg⁻¹).

O solo que apresenta o valor mais elevado de CTC é o amostrado no local L5, o que se poderá dever ao facto do teor em MO deste solo ser mais elevado (2,6%). De facto, uma CTC elevada poderá estar associada a teores elevados de substâncias coloidais nos solos, quer de natureza orgânica (*e.g.* substâncias húmicas) quer de natureza inorgânica (*e.g.* minerais de argila). Como, neste caso, não existem diferenças significativas no que toca ao teor de argila, as diferenças na CTC dos solos devem estar relacionadas com o maior ou menor teor de MO de cada solo.

Será importante verificar que, de uma forma geral, será o solo amostrado no local L5 o que apresenta melhores condições nutricionais. De facto, apesar de corresponder a um local de amostragem na Mina de São Domingos, apresenta até melhores condições do que o solo amostrado num local fora da influência das actividades mineiras (L6), uma vez que possui um pH mais próximo da neutralidade, baixa salinidade, e um teor mais elevado de matéria orgânica, azoto total e fósforo “assimilável”. A avaliar por estes resultados, e pelo facto de esse local de amostragem apresentar muita vegetação, tudo indica ser este um local com boas condições de “habitat”.

Tabela 5. Principais características físico-químicas dos solos amostrados (média \pm desvio-padrão, $n = 3$). Valores na mesma linha seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).

| Parâmetro | Local de Amostragem | | | | | |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 |
| pH (1:2,5) | 2,96 \pm 0,03 a | 4,26 \pm 0,05 b | 5,78 \pm 0,04 c | 2,98 \pm 0,03 a | 6,66 \pm 0,06 e | 5,99 \pm 0,10 d |
| CE (mS cm ⁻¹) | 3,38 \pm 0,04 c | 4,95 \pm 0,05 d | 5,51 \pm 0,12 d | 1,62 \pm 0,53 b | 0,98 \pm 0,01 a | 0,52 \pm 0,01a |
| MO (%) | 0,8 \pm 0,3 a | 0,5 \pm 0,6 a | 0,7 \pm 0,4 a | 0,4 \pm 0,1a | 2,6 \pm 0,2 b | 2,1 \pm 0,5 b |
| N_{Kjeldahl} (%) | 0,09 \pm 0,00 a | 0,11 \pm 0,01 a | 0,11 \pm 0,02 a | 0,11 \pm 0,03 a | 0,21 \pm 0,06 b | 0,12 \pm 0,04 a |
| P “Assimilável” (mg P ₂ O ₅ Kg ⁻¹) | 4,5 \pm 2,4 a | 3,8 \pm 2,9 a | 1,0 \pm 0,5 a | 0,7 \pm 0,3 a | 26,2 \pm 2,0 c | 17,4 \pm 1,2 b |
| K “Assimilável” (mg K ₂ O Kg ⁻¹) | 26,1 \pm 10,7 a | 10,9 \pm 1,3 a | 48,9 \pm 21,9 a | 14,2 \pm 2,7 a | 52,6 \pm 5,9 a | 160,0 \pm 38,7 b |
| CTC (meq 100g ⁻¹) | 1,0 \pm 1,1 a | 1,8 \pm 0,6 a | 10,4 \pm 0,3 d | 4,2 \pm 0,6 b | 13,1 \pm 0,1 e | 5,9 \pm 0,1 c |

7.2. Teor em metais nos solos

Nas Tabelas 6, 7, 8 e 9, apresentam-se os resultados obtidos para o As, Cu, Pb e Zn associados às diferentes frações analisadas (teor total, efetivamente disponível/móvel, e potencialmente biodisponível/mobilizável).

As concentrações de As total são bastantes elevadas, encontrando-se acima dos valores limite estabelecidos pela Norma Canadense para a qualidade do solo para uso industrial (12 mg kg^{-1}) (CCME, 2006) (Tabela 6). Os valores mais elevados foram encontrados nas amostras nos locais L1 e L5. Porém, a concentração desse metalóide nas frações potencialmente e efetivamente biodisponíveis é baixa, representando uma percentagem bastante reduzida do total. A única exceção é o solo amostrado no local L5, com um teor em As na fração potencialmente biodisponível consideravelmente elevada, quando comparada com os outros locais.

Considerando o teor total em Cu (Tabela 7), todas as amostras de solo recolhidas em locais da Mina de São Domingos (L1 a L5) excederam o valor de referência das normas Canadenses para o Cu (91 mg kg^{-1}). Apesar do seu teor na fração efetivamente biodisponível ter sido inferior ao valor de referência em todos os locais de amostragem, foram encontrados elevados valores na fração potencialmente biodisponível no solo dos locais L3 e L5: 25% e 33% do teor total.

Tal como aconteceu nos metais estudados até aqui, a concentração total do Pb (Tabela 8) nos diferentes locais da Mina de São Domingos (L1 a L5), também excede os valores de referência da norma Canadense para esse metal (600 mg kg^{-1}) (CCME, 2006). Na maioria dos solos, as frações biodisponíveis desse metal são relativamente baixas, tanto potencialmente como efetivamente biodisponíveis, com menos de 10% do conteúdo total nessas formas. A exceção a esta regra foi a amostra colhida no local L2, onde foram encontrados teores de Pb elevados, mesmo nas frações potencialmente e efetivamente biodisponíveis; cerca de 44% do teor total desse elemento encontra-se numa forma mobilizável no solo, o que corresponde a uma concentração de 4740 mg kg^{-1} de Pb.

O comportamento do Zn (Tabela 9) também seguiu o mesmo padrão dos elementos anteriores, com valores superiores ao valor de referência para todos os solos de locais de amostragem na Mina de São Domingos (L1 a L5). Também para este elemento, os teores mais elevados em termos de biodisponibilidade foram encontrados na fração potencialmente biodisponível dos solos dos locais L3 e L5: 32% e 36% do teor total, respectivamente.

Tabela 6. Resultados obtidos para o As nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).

| Local de amostragem | Teor total (mg kg ⁻¹) | Potencialmente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Efectivamente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Valor-limite das Normas do Canadá ⁽¹⁾ |
|---------------------|-----------------------------------|---|------------|--|------------|--|
| | | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | |
| 1 | 1956 ± 403 c | 0,80 ± 0,39 ab | 0,04 | 0,11 ± 0,09 ab | 0,01 | 12 |
| 2 | 1777 ± 94 bc | 1,07 ± 0,02 b | 0,06 | 0,13 ± 0,05 ab | 0,01 | |
| 3 | 746 ± 33 ab | 0,19 ± 0,03 ab | 0,03 | 0,07 ± 0,04 ab | 0,01 | |
| 4 | 753 ± 32 ab | 0,27 ± 0,09 ab | 0,04 | 0,05 ± 0,01 ab | 0,01 | |
| 5 | 5598 ± 899 d | 9,45 ± 0,78 c | 0,17 | 0,18 ± 0,02 b | 0,06 | |
| 6 | 32 ± 3 a | 0,08 ± 0,02 a | 0,24 | <LQ* | - | |

*LQ: limite de quantificação; LQ (As) = 0,050 mg kg⁻¹.

¹ Valores de referência para alguns metais existentes nas normas Canadenses (*Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*) para solos de uso industrial (CCME, 2006).

Tabela 7. Resultados obtidos para o Cu nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).

| Local de amostragem | Teor total (mg kg ⁻¹) | Potencialmente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Efectivamente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Valor-limite das Normas do Canadá |
|---------------------|-----------------------------------|---|------------|--|------------|-----------------------------------|
| | | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | |
| 1 | 562 ± 54 b | 9,00 ± 0,47 a | 1,60 | 4,39 ± 1,15 b | 0,78 | 91 |
| 2 | 520 ± 18 b | 41,26 ± 3,47 a | 7,93 | 4,66 ± 1,16 b | 0,89 | |
| 3 | 1812 ± 136 c | 453,79 ± 54,46 c | 25,04 | 1,82 ± 0,60 a | 0,10 | |
| 4 | 1928 ± 122 c | 19,36 ± 1,84 a | 1,00 | 12,33 ± 1,19 c | 0,64 | |
| 5 | 484 ± 115 b | 161,36 ± 26,14 b | 33,32 | 0,52 ± 0,04 a | 0,11 | |
| 6 | 19 ± 2 a | 1,12 ± 0,07 a | 5,88 | <LQ* | - | |

*<LQ: limite de quantificação; LQ (Cu) = 0,500 mg kg⁻¹.

Tabela 8. Resultados obtidos para o Pb nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).

| Local de amostragem | Teor total (mg kg ⁻¹) | Potencialmente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Efectivamente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Valor-limite das Normas do Canadá |
|---------------------|-----------------------------------|---|------------|--|------------|-----------------------------------|
| | | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | |
| 1 | 3648 ± 111 c | 70,19 ± 4,43 a | 1,92 | <LQ** | - | 600 |
| 2 | 10795 ± 856 d | 4740,89 ± 474,42 b | 43,92 | 72,42 ± 8,18 b | 0,67 | |
| 3 | 1163 ± 129 b | 91,31 ± 9,51 a | 7,85 | <LD*** | - | |
| 4 | 1049 ± 88 ab | 3,88 ± 0,62 a | 0,37 | <LD*** | - | |
| 5 | 14041 ± 445 e | 445,54 ± 72,41 a | 3,17 | <LD*** | - | |
| 6 | <LQ * | <LQ** | - | <LD*** | - | |

*LQ: abaixo do limite de quantificação para os metais totais; LQ (Pb) = 20 mg kg⁻¹.

**<LQ: abaixo do limite de quantificação para os metais potencialmente biodisponíveis e efectivamente biodisponíveis; LQ (Pb) = 5 mg kg⁻¹.

***<LD: abaixo do limite de detecção para os metais efectivamente biodisponíveis; LD (Pb) = 0,167 mg kg⁻¹.

Tabela 9. Resultados obtidos para o Zn nas diferentes frações analisadas (média ± desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).

| Local de amostragem | Teor total (mg kg ⁻¹) | Potencialmente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Efectivamente biodisponível (mg kg ⁻¹) | | Valor-limite das Normas do Canadá |
|---------------------|-----------------------------------|---|------------|--|------------|-----------------------------------|
| | | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | Teor (mg kg ⁻¹) | % do total | |
| 1 | 816 ± 239 b | 29,16 ± 2,10 a | 3,58 | 30,19 ± 0,67 b | 3,70 | 360 |
| 2 | 879 ± 132 b | 149,09 ± 7,82 b | 16,96 | 81,34 ± 11,94 c | 9,25 | |
| 3 | 2023 ± 246 d | 645,21 ± 12,89 d | 31,90 | 44,00 ± 18,44 b | 2,18 | |
| 4 | 2140 ± 146 d | 4,92 ± 0,27 a | 0,23 | 4,29 ± 0,34 a | 0,20 | |
| 5 | 1415 ± 125 c | 511,32 ± 86,82 c | 36,15 | 5,23 ± 0,84 a | 0,37 | |
| 6 | 68 ± 1 a | 2,06 ± 0,23 a | 3,02 | 0,80 ± 0,08 a | 1,17 | |

Considerando os resultados obtidos para o As, Cu, Pb e Zn, apresentados anteriormente, é importante realçar alguns pontos:

- As concentrações totais desses elementos nos solos da Mina de São Domingos (L1 a L5) são elevadas, excedendo largamente os valores limites estabelecidos pela Norma Canadense para a qualidade do solo para uso industrial;
- Nalguns locais, e para alguns elementos, os teores desses elementos na fração potencialmente biodisponível é igualmente elevada, excedendo o valor de referência: Cu nos locais L3 e L5, Pb no local L2, e Zn nos locais L3 e L5;
- O solo do local L5 distingue-se também por apresentar teores elevados de As e Pb na fração potencialmente biodisponível;
- O solo dos locais L2 e L5 caracteriza-se por ter teores elevados de As e Pb;
- O solo dos locais L3 e L4 caracteriza-se por ter teores elevados de Cu e Zn;
- Duma forma geral, os teores dos diferentes elementos na fração efetivamente biodisponível foram baixos: menos de 1% do total para o As, Cu e Pb, e menos de 10% do total no caso do Zn;
- O valor de pH próximo da neutralidade do solo do local L5, em conjugação com o facto de ser o solo com maior teor em MO e uma maior CTC, pareceram exercer um efeito muito importante na imobilização dos elementos analisados: apesar dos seus teores totais serem muito elevadas, os seus teores na fração efetivamente biodisponível são menores do que, ou sem diferença significativa, dos valores encontrados para esses elementos nos locais L1 a L4;
- Por fim, de realçar o facto de o solo do local L5, que anteriormente se evidenciou por apresentar as melhores características de todos os locais em termos nutricionais, ser o que, em termos da contaminação por metais, avaliada através dos seus teores totais, o que mais se destaca.

7.3. Avaliação da ecotoxicidade do solo

7.3.1. Ensaio de mortalidade com *E. fetida*

No ensaio de mortalidade com *E. fetida* não se observou mortalidade para nenhuma das concentrações utilizadas no ensaio, após os 14 dias de exposição, não tendo sido possível calcular os valores de EC₅₀.

Como consequência do facto de não se ter verificado toxicidade aguda, escolheram-se as mesmas concentrações de solo teste para serem utilizadas no ensaio crónico: 0, 25, 50, 75 e 100% p/p.

7.3.2. Ensaio de reprodução com *E. fetida*

Os resultados obtidos no ensaio de reprodução com *E. fetida* encontram-se na Figura 14. Verificou-se um efeito de estimulação da reprodução das minhocas expostas ao solo do local L5, e um efeito contrário nos organismos expostos aos solos recolhidos nos outros pontos de amostragem. O solo que evidenciou um maior efeito de inibição da reprodução, por isso mais tóxico de acordo com este ensaio, foi o solo do local L4, com um valor de LOEC de 25% (p/p), e com um valor de EC₅₀ de 4% (p/p) (Tabela 10). A variabilidade entre réplicas encontrada nas outras concentrações impediu o cálculo do valor de EC₅₀, tendo-se obtido uma resposta tóxica semelhante para esses solos (L1, L2, L3 e L6).

Pode parecer estranho que seja no solo do local L5, onde a contaminação por metais foi uma das mais acentuadas, que foram encontrados melhores resultados neste bioensaio. Porém, não nos podemos esquecer que foi também neste local que foram encontradas as melhores condições nutricionais, nomeadamente pH mais alto e teor mais elevado em matéria orgânica e azoto total, factores estes que podem ter sido os causadores deste estímulo que se verificou na reprodução das minhocas.

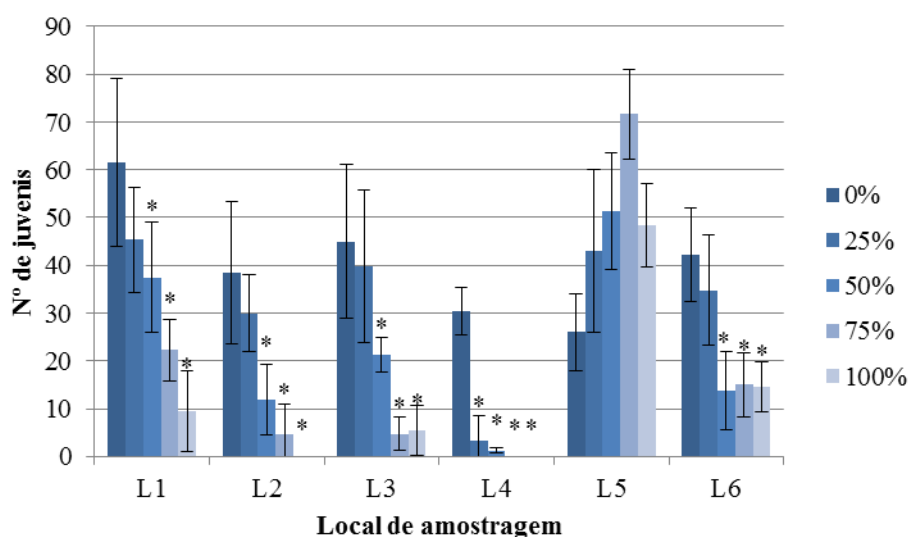


Figura 14. Resultados dos ensaios de reprodução com *E. fetida* (média \pm desvio-padrão, n = 4). Barras marcadas com (*) representam valores significativamente diferentes do grupo controlo em solo artificial (0%) (Teste de Dunnett).

Tabela 10. Resultados obtidos para os parâmetros ecotoxicológicos no ensaio de reprodução.

| Local de Amostragem | NOEC (%) | LOEC (%) | EC50 (%) |
|---------------------|----------|----------|----------|
| L1 | 25 | 50 | N.C. |
| L2 | 25 | 50 | N.C. |
| L3 | 25 | 50 | N.C. |
| L4 | < 25 | 25 | 4 |
| L5 | N.C. | N.C. | N.C. |
| L6 | 25 | 50 | N.C. |

Legenda:

NOEC (No Observable Effect Concentration): Valor máximo de concentração sem efeito sobre os organismos (% p/p).

LOEC (Lowest Observable Effect Concentration): Valor mínimo de concentração onde se observa efeito sobre os organismos (% p/p).

EC₅₀: Valor de concentração onde se observa efeito em 50% dos organismos expostos, ou onde se observa uma redução de 50% na resposta, relativamente ao controlo (% m/m).

N.C.: Não calculado.

O solo amostrado no local L4 foi identificado como o mais tóxico entre os seis, em conformidade com os resultados anteriores: foi um dos solos que apresentou maior contaminação em metais e piores condições nutricionais. Porém, é importante destacar uma característica desses bioensaios, já apontado por outros autores (Amorim *et al.*, 2008; Udovic e Lestan, 2010) e pela ISO (ISO 17512-1, 2008): as propriedades do solo precisam ser consideradas na interpretação dos resultados e, neste estudo, as propriedades do solo variavam muito de local para local, principalmente entre o local L5 e os outros locais de amostragem na mina (L1 a L4).

7.3.3. Ensaio de germinação com *L. sativa*

Pelos resultados obtidos no ensaio de germinação com *L. sativa*, podemos verificar que o solo que produziu uma maior resposta tóxica foi o solo do local L4, logo seguido do solo do local L2 (Fig. 15). Os solos dos locais L1 e L3 apresentaram, neste caso, uma resposta tóxica muito semelhante. O efeito observado no caso do solo do local L5 foi, neste caso, insuficiente para permitir o cálculo de EC₅₀ (Tabela 11).

Também neste caso se verificou uma situação semelhante à do bioensaio de reprodução: o facto de o solo do local L5 ter sido o que evidenciou menor toxicidade, apesar do seu elevado teor em metais, pode estar relacionado com o facto de possuir melhores características nutricionais.

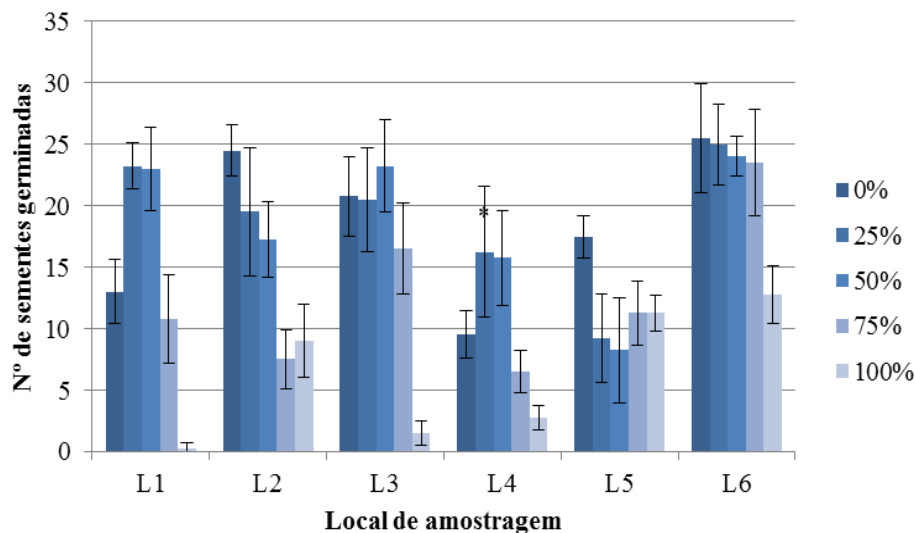


Figura 15. Resultados dos ensaios de germinação com *L. sativa* (média \pm desvio-padrão, n = 4).

Tabela 11. Resultados obtidos para os parâmetros ecotoxicológicos no ensaio de germinação.

| Local de Amostragem | EC ₅₀ (%) | 95% CI (%) |
|---------------------|----------------------|------------|
| L1 | 44 | [39;48] |
| L2 | 23 | [9;38] |
| L3 | 44 | [38;50] |
| L4 | 20 | [9;31] |
| L5 | N.C. | N.C. |
| L6 | 71 | [51;82] |

Legenda:

EC₅₀: Valor de concentração onde se observa efeito em 50% dos organismos expostos, ou onde se observa uma redução de 50% na resposta, relativamente ao controlo (% , m/m).

95% CI (%): Intervalo de confiança para o valor de EC₅₀ calculado (nível de confiança 95%).

N.C.: Não calculado.

7.3.4. Bioacumulação de metais pesados por *E. fetida*

Considerando as concentrações de As, Cu, Pb e Zn bioacumuladas pela *E. fetida* (Fig. 16, 17, 18 e 19), verificou-se que, em alguns locais, esses valores foram significativamente superiores aos demais.

Aparentemente, esses locais parecem ter uma relação com os locais onde os teores de As e Pb totais foram os mais elevados, mas o mesmo não acontece para o caso do Cu e Zn. Estes resultados confirmam o facto de que a biodisponibilidade ambiental de um elemento pode não estar relacionada com a concentração total desse elemento.

É ainda mais difícil perceber uma relação entre os teores em metais efetivamente biodisponíveis (extraídos com CaCl_2 0,01M) e os teores desses metais bioacumulados. Este facto foi evidente no solo do local L5: apesar de os seus teores em As, Cu, Pb e Zn efetivamente biodisponíveis serem mais baixos de que, ou sem diferença significativa, em relação aos teores encontrados nos outros locais amostrados, os teores bioacumulados pela *E. fetida* exposta ao solo do local L5 foram os maiores no caso do As, Pb e Zn, e os segundos maiores no caso do Cu.

Menos esperado ainda, esses locais onde foram encontrados valores de bioacumulação mais elevados não correspondem aos locais onde se observaram respostas tóxicas mais acentuadas (solo do local L4). De facto, os valores mais elevados de bioacumulação aconteceram, de uma maneira geral, na exposição ao solo do local L5, justamente aquele onde as respostas tóxicas foram as menores.

Na tentativa de encontrar alguma relação entre os valores de bioacumulação e os teores de As, Cu, Pb e Zn nas diferentes frações, pode verificar-se que os valores mais elevados de bioacumulação ocorreram justamente nos locais onde os teores desses elementos na fração mobilizável/potencialmente biodisponível foi a mais elevada. Por esse motivo, foram encontrados valores bastante elevados para os coeficientes de correlação de Pearson calculados entre os teores de As, Cu, Pb e Zn bioacumulados por *E. fetida* e esses mesmos elementos na fração mobilizável/potencialmente biodisponível (extraídos com uma solução 0,5 M de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 0,5 M de CH_3COOH e 0,02 M em EDTA, tamponizada a pH 4,7) (Tabela 12).

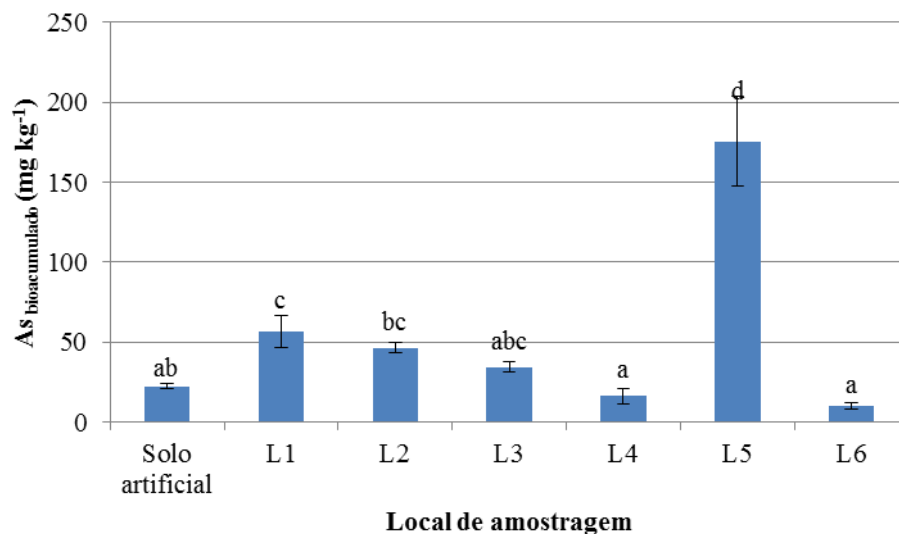


Figura 16. Bioacumulação de As pela *E. fetida* depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média ± desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$).

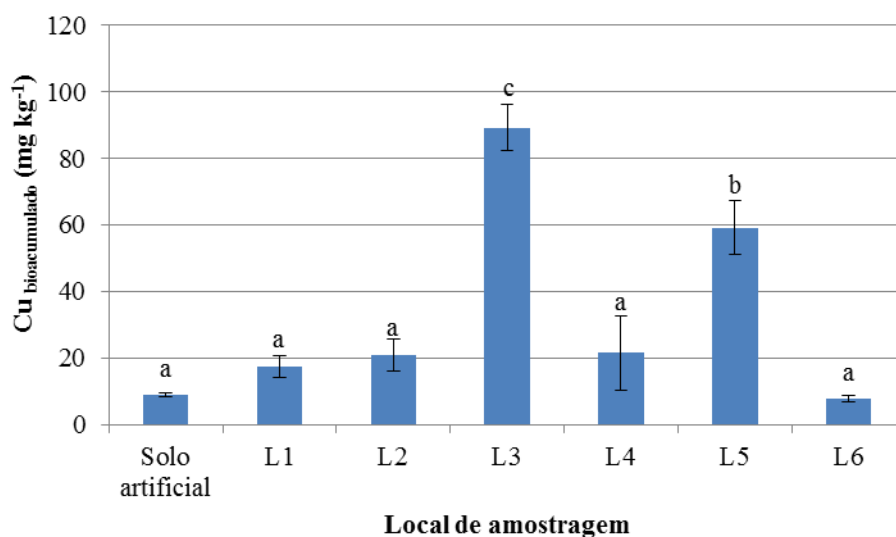


Figura 17. Bioacumulação de Cu pela *E. fetida* depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média ± desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$).

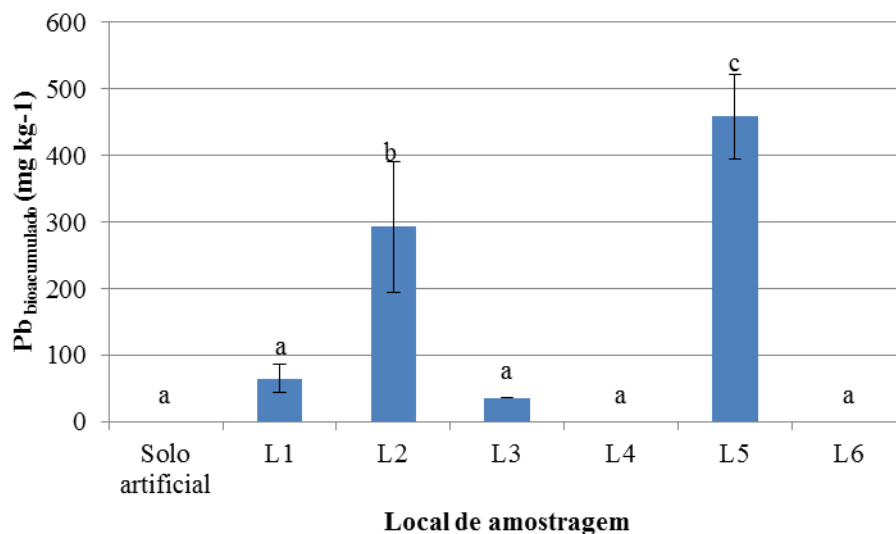


Figura 18. Bioacumulação de Pb pela *E. fetida* depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média ± desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$).

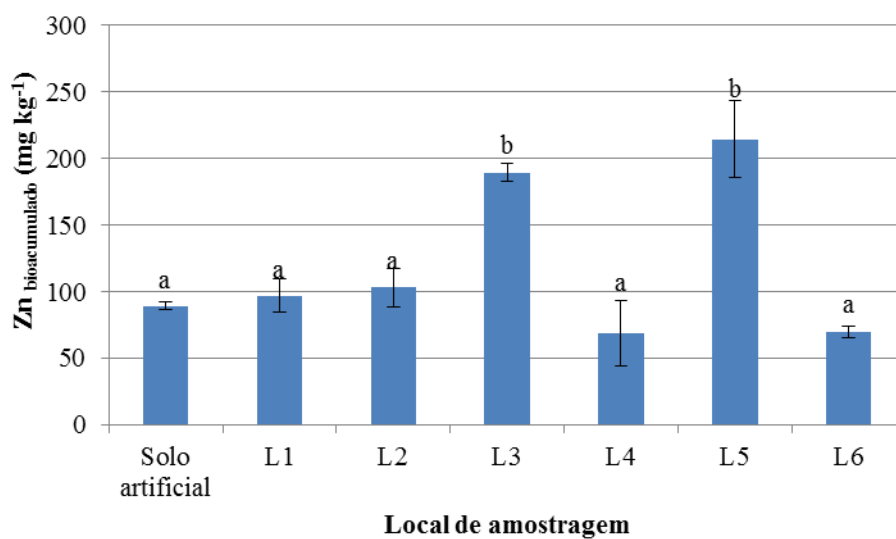


Figura 19. Bioacumulação de Zn pela *E. fetida* depois de uma exposição de 28 d aos solos teste (média ± desvio padrão, n=3). Barras marcadas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey HSD, $P > 0,05$).

Tabela 12. Coeficientes de correlação de Pearson calculados para os teores em As, Cu, Pb e Zn bioacumulados pela *E. fetida* durante os 28 dias de exposição aos solos, e os respetivos teores no solo nas diferentes frações (n = 18). As correlações marcadas são significativas para um nível de significância $*P < 0,05$.

| | As bioacumulado | Cu bioacumulado | Pb bioacumulado | Zn bioacumulado |
|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| As total | 0,93* | 0,30 | 0,84* | 0,62* |
| Cu total | -0,28 | 0,46 | -0,36 | 0,10 |
| Pb total | 0,83* | 0,17 | 0,97* | 0,52* |
| Zn total | 0,09 | 0,61* | -0,02 | 0,37 |
| As móvel | 0,69* | 0,23 | 0,71* | 0,47* |
| Cu móvel | -0,37 | -0,32 | -0,30 | -0,50* |
| Pb móvel | -0,05 | -0,22 | 0,43 | -0,14 |
| Zn móvel | -0,11 | 0,14 | 0,26 | 0,10 |
| As mobilizável | 0,94* | 0,33 | 0,81* | 0,66* |
| Cu mobilizável | 0,14 | 0,95* | 0,04 | 0,74* |
| Pb mobilizável | 0,02 | -0,18 | 0,49* | -0,07 |
| Zn mobilizável | 0,50* | 0,96* | 0,40 | 0,92* |

No caso do As, quanto maior a concentração desse metalóide no solo, independentemente da sua forma (*e.g.* total, mobilizável ou móvel) maior a concentração bioacumulada pela *E. fetida*. Como consequência, obtiveram-se correlações significativas entre as diferentes frações de As e os valores bioacumulados.

No caso do Cu, apenas se verificou correlação significativa entre o teor bioacumulado e o teor na fração potencialmente biodisponível, com uma correlação bastante elevada ($r = 0,95$).

No caso do Pb, foi encontrada uma correlação muito significativa entre o seu teor bioacumulado e o seu teor total no solo, não se tendo verificado o mesmo facto nem para o Cu nem para o Zn. Aliás, de um modo geral, onde foram encontradas correlações significativas para todos os elementos analisados, foi entre os teores bioacumulados e os teores dos mesmos elementos na fração mobilizável/potencialmente biodisponível: os teores dos diferentes elementos bioacumulados pela *E. fetida* são relativamente maiores quando estas são expostas a solos recolhidos em locais em que a fracção mobilizável desses elementos é também maior.

Como consequência deste facto, pode considerar-se que a avaliação da biodisponibilidade pelo método químico da extração com solução 0,5 M em $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 0,5 M em CH_3COOH e 0,02M em EDTA, pH 4,7, que extrai a fração dita mobilizável ou potencialmente biodisponível, é apropriada para avaliar a biodisponibilidade ambiental de As, Cu, Pb e Zn para a *E. fetida*.

7.4. Atividades enzimáticas do solo

As enzimas do solo têm sido relatadas como sendo altamente sensíveis aos metais e metalóides e, portanto, têm sido recomendadas como indicadores bioquímicos padrão para uso na avaliação do risco de solos poluídos (Pereira *et al.*, 2006; Hinojosa *et al.*, 2004; Alvarenga, 2009).

A desidrogenase é uma oxedorredutase, que está presente apenas em células viáveis. Portanto, os resultados da atividade enzimática desta enzima representam a atividade média da população microbiana de um solo, o que poderia ser usado como um indicador da saúde do solo (Tabatabai, 1994; Izquierdo *et al.*, 2005; Alvarenga, 2009). Hidrolases do solo, como β -glucosidase e fosfatase ácida, são indicadores sensíveis da qualidade do solo, devido à sua forte relação com a matéria orgânica do solo em conteúdo e qualidade (Pereira *et al.*, 2006; Izquierdo *et al.*, 2005; Alvarenga, 2009). A Urease tem um papel fundamental na libertação do N inorgânico, estando portanto envolvido no ciclo de N (Dick e Bandick, 1999; Alvarenga, 2009). Tripathi *et al.* (2007) descrevem esta enzima como sendo a mais pertinente enzima envolvida no ciclo de N.

Através da análise realizada à desidrogenase (Tabela 13), podemos verificar que as amostras de solo que apresentaram maior atividade enzimática foram as amostras dos locais L5 e L6. As restantes amostras apresentam valores inferiores ao limite de detecção ($0,4 \text{ mg TPF g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$), provavelmente como resultante de se tratar de solos com pH e teor de matéria orgânica muito baixo (L1, L2 e L4) e por ocorrer contaminação em metais nesses solos. Os valores mais elevados de atividade de β -Glucosidase ocorreram, mais uma vez, nas amostras colhidas nos locais L5 e L6 ($0,65 \text{ mmol } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ e $0,5 \text{ mmol } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ MS. h}^{-1}$, respetivamente), verificando-se um decréscimo significativo para os restantes solos amostrados. A amostra de solo do local L4 apresenta o valor mínimo de atividade enzimática ($0,08 \text{ mmol } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$).

A atividade da fosfatase ácida (Tabela 13) apresenta o seu máximo na amostra de solo do local L5 ($0,25 \text{ mmol } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$), vindo mais uma vez ao encontro dos

resultados anteriores, e enfatizando a importância das condições nutricionais do solo na sua atividade enzimática. Será também importante, mais uma vez, lembrar que este local tinha muitas plantas, o que também poderá ter influência nos outros parâmetros biológicos de avaliação da qualidade do solo.

Na Tabela 13. verifica-se que a amostra de solo do local L6 apresenta a atividade enzimática máxima de urease ($0,98 \mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$), o que pode estar relacionado com o facto de esta ser a amostra de solo com pH (5,9) mais próximo do considerado óptimo (6-7). Não ocorre qualquer atividade da urease nas amostras de solo dos locais L1, L4 e L5, o que indica uma atividade enzimática baixa desta enzima.

Neste estudo, os valores mais baixos de atividades enzimáticas foram encontrados para os solos dos locais L1 e L4, de acordo com o facto destes apresentarem, simultaneamente, o menor teor de MO e elementos nutricionais, pH mais ácido e concentrações elevadas de metais e metalóides: estes aparentam ser os fatores mais importantes que, quando conjugados, afetam a atividade da comunidade microbiana do solo.

Tabela 13. Resultados obtidos para as atividades enzimáticas dos solos (média \pm desvio-padrão, n=3).

| Local de amostragem | Desidrogenase (mg TPF g ⁻¹ MS h ⁻¹) | β-glucosidase (mmol <i>p</i> -nitrofenol. g ⁻¹ MS h ⁻¹) | Fosfatase ácida (mmol <i>p</i> -nitrofenol. g ⁻¹ MS h ⁻¹) | Urease (μ mol N-NH ₄ ⁺ g ⁻¹ MS h ⁻¹) |
|----------------------------|--|---|--|--|
| L1 | < LD* | 0,24 \pm 0,06 | 0,12 \pm 0,01 | < LD** |
| L2 | < LD* | 0,28 \pm 0,06 | 0,14 \pm 0,02 | 0,92 \pm 0,07 |
| L3 | < LD* | 0,10 \pm 0,03 | 0,13 \pm 0,02 | 0,75 \pm 0,06 |
| L4 | < LD* | 0,08 \pm 0,06 | 0,12 \pm 0,09 | < LD** |
| L5 | 2,8 \pm 1,1 | 0,65 \pm 0,06 | 0,25 \pm 0,10 | < LD** |
| L6 | 3,4 \pm 0,8 | 0,55 \pm 0,01 | 0,19 \pm 0,004 | 0,98 \pm 0,02 |

*<LD: abaixo do limite de detecção da desidrogenase; LD (Desidrogenase) = 0,4 mg TPF.g⁻¹ MS.h⁻¹.

**<LD: abaixo do limite de detecção da urease; LD (Urease) = 0,31 mg TPF.g⁻¹ MS.h⁻¹.

7.5. Metais totais nas plantas

Os elementos que ocorrem na forma disponível nos solos podem ser absorvidos e, eventualmente, acumulados pela vegetação. Nas Tabelas 14 e 15 apresentam-se as concentrações totais de As, Cu, Pb e Zn analisados nas amostras de esteva (*C. ladanifer*) e urze (*E. andevalensis*) colhidas nos diferentes locais de amostragem.

Para os elementos analisados, há que realçar que estamos a falar de elementos muito distintos no que toca à sua essencialidade para a planta: o As e o Pb são elementos não essenciais para as plantas, a que elas não deveriam estar expostas nem necessitam de acumular, enquanto o Cu e Zn são micronutrientes essenciais para as plantas, sendo que os solos em questão apresentam valores que excedem largamente os valores considerados essenciais para as plantas, para ambos os elementos. Para facilitar a análise dos resultados dos teores em metais e em metalóides nas plantas, foram utilizados dois tipos de valores limite (Mendes e Maier, 2008):

- **Limite de toxicidade de cada elemento para as plantas**, que representa o valor, ou intervalo de valores, que não deveriam ser excedidos em “plantas saudáveis”, correndo-se o risco de elas poderem apresentar sintomatologia de toxicidade;
- **Limite de toxicidade de cada elemento em plantas para consumo animal**, que representa o valor que não deveria ser excedido em plantas utilizadas em alimentação animal (forragem ou pasto). Neste caso, estando nós em presença de plantas silvestres, que não se destinam ao consumo animal, o uso deste valor limite tem o único propósito de poder servir como indicador de que a concentração desse metal ou metalóide nessa planta, mesmo que silvestre, não conduz a um risco de entrada desse elemento na cadeia alimentar humana.

Por outro lado, para que se perceba o comportamento destas plantas em relação a estes elementos no solo, é importante que se calculem os valores dos fatores de concentração (FC) de cada planta em relação a cada um destes elementos, podendo estes ser calculados como a razão entre a concentração do elemento nas folhas da planta e a sua concentração no solo.

O cálculo dos FC de cada planta em relação a cada elemento permite avaliar qual o seu comportamento em relação a esse metal (*e.g.* exclusora, indicadora, acumuladora, hiper-acumuladora), bem como avaliar a possibilidade da sua utilização numa estratégia de fitorremediação de solos (Alvarenga *et al.*, 2004):

- $FC > 1$: estamos na presença de uma planta acumuladora de metais ou metalóides, podendo ser utilizada numa estratégia de fitoextração de solos contaminados com esse(s) elementos (Alvarenga *et al.*, 2004);
- $FC < 1$: estamos na presença de uma planta exclusora de metais ou metalóides, podendo ser utilizada numa estratégia de fitoestabilização de solos contaminados com esse(s) elementos (Alvarenga *et al.*, 2004). De facto, é importante assegurar esse facto para que se possa garantir que essa estratégia de remediação de solos não vai contribuir para a entrada desse elemento, potencialmente tóxico, na cadeia alimentar humana ou animal.

Considerando os resultados obtidos (Tabela 14 e 15), podemos verificar que foi impossível quantificar o teor em Pb nas folhas de ambas as plantas, uma vez que os seus teores se apresentaram abaixo do limite de deteção da técnica analítica utilizada, e que foi de $41,7 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ MS}$. Esse resultado não nos permite avaliar se os teores de Pb nas plantas se encontram, ou não, abaixo dos limite de toxicidade de ambas as plantas, uma vez que esse valor se situa dentro do intervalo de valores de toxicidade para esse elemento. Porém, esse resultado é suficiente para podermos afirmar que, tanto a esteva como a urze que crescem na zona da Mina de São Domingos, apresentam um teor em Pb abaixo do limite de toxicidade em plantas para consumo animal. Por isso, o risco de entrada desse elemento na cadeia alimentar por consumo dessas plantas por algum organismo selvagem é muito reduzido.

De facto, o mesmo pode ser dito relativamente a todos os outros elementos, uma vez que em ambas as plantas os teores em As, Cu e Zn correspondem a valores que estão abaixo dos limite de toxicidade em plantas para consumo animal (Mendez e Maier, 2008).

Considerando os valores dos FC calculados para o As, Cu e Zn para ambas as plantas, podemos verificar que eles são < 1 no caso de As e do Cu, indicando que essas plantas se comportam como exclusoras relativamente a esses metais. Os valores de FC mais elevados, mas ainda assim < 1 , foram encontrados para o elemento Zn na esteva, em concordância com os resultados encontrados por outros autores (Alvarenga *et al.*, 2004; Alvarenga, 2010). Podemos pois considerar que estas plantas podem ser utilizadas em estratégias de fitoestabilização de solos de minas abandonadas semelhantes a São Domingos, ou seja, todas as situadas na FPI, uma vez que não acumulam os metais potencialmente tóxicos que podem apresentar concentrações muito elevadas em alguns locais dessas minas. Importante será também dizer que ambas as plantas nascem espontaneamente nestes solos, sendo que, se a esteva (*C. ladanifer*) pode apresentar uma queda de folha nalguns destes locais, que pode ser

interpretada como um indicador de fitotoxicidade, a urze (*E. andevalensis*) apresenta, em todos os locais de amostragem, um aspeto de enorme vitalidade, indicador de uma adaptação mesmo às condições extremas de alguns locais utilizados no estudo.

No caso da esteva, os teores de As mais elevados foram encontrados nas plantas do local L5, significativamente mais elevados do que nos restantes locais. No caso do Cu, os teores encontrados na esteva em todos os locais da Mina de São Domingos são estatisticamente semelhantes, apresentando apenas diferenças significativas relativamente às plantas amostradas no local L6. No caso do Zn, os teores obtidos nas estevas dos locais L3 e L4 são significativamente superiores aos encontrados nas outras plantas.

Tabela 14. Resultados obtidos para o teor em As, Cu, Pb e Zn em amostras de *C. ladanifer* recolhidas nos diferentes locais de amostragem (média \pm desvio-padrão, $n = 3$). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $P > 0,5$).

| Local de amostragem | As (mg kg ⁻¹ MS) | Cu (mg kg ⁻¹ MS) | Pb (mg kg ⁻¹ MS) | Zn (mg kg ⁻¹ MS) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 1,6 \pm 0,2 b | 9 \pm 2 ab | < LD | 90 \pm 19 a |
| 2 | 1,3 \pm 0,1 ab | 7 \pm 2 ab | < LD | 77 \pm 15 a |
| 3 | 2,1 \pm 0,5 b | 11 \pm 3 b | < LD | 181 \pm 8 b |
| 4 | 1,5 \pm 0,2 b | 8 \pm 1 ab | < LD | 205 \pm 49 b |
| 5 | 10,3 \pm 0,8 c | 9,7 \pm 0,4 ab | < LD | 69 \pm 4 a |
| 6 | 0,3 \pm 0,1 a | 5,8 \pm 0,8 a | < LD | 52 \pm 12 a |
| Limite de toxicidade para esse elemento na planta (*) | 5-20 | 2-20 | 3-100 | 100-400 |
| Limite de toxicidade em plantas para consumo animal (*) | 30 | 40 | 100 | 500 |
| Factores de concentração (FC) | | | | |
| Média | 0,003 | 0,06 | – | 0,20 |
| Máximo | 0,008 | 0,31 | – | 0,75 |
| Mínimo | 0,001 | 0,004 | – | 0,05 |

LD(Pb) = 41,7 mg kg⁻¹ MS; (*) Mendez e Maier (2008).

Tabela 15. Resultados obtidos para o teor em As, Cu, Pb e Zn em amostras de *E. andevalensis* recolhidas nos diferentes locais de amostragem (média \pm desvio-padrão, n = 3). Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas (Tukey HSD, $p > 0,5$).

| Local de amostragem | As (mg kg ⁻¹ MS) | Cu (mg kg ⁻¹ MS) | Pb (mg kg ⁻¹ MS) | Zn (mg kg ⁻¹ MS) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 7,9 \pm 0,7 c | 10,4 \pm 0,8 bc | < LD | 52 \pm 9 a |
| 2 | 2,15 \pm 0,05 a | 16 \pm 8 bc | < LD | 77 \pm 10 a |
| 3 | 2,0 \pm 0,4 a | 7 \pm 1 ab | < LD | 56 \pm 35 a |
| 4 | 4,80 \pm 0,07 b | 20 \pm 3 c | < LD | 84 \pm 21 a |
| 5 | 4,0 \pm 0,9 b | 15 \pm 1 bc | < LD | 101 \pm 10 a |
| 6 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| Limite de toxicidade para esse elemento na planta (*) | 5-20 | 2-20 | 3-100 | 100-400 |
| Limite de toxicidade em plantas para consumo animal (*) | 30 | 40 | 100 | 500 |
| Factores de concentração (FC) | | | | |
| Média | 0,003 | 0,02 | – | 0,06 |
| Máximo | 0,006 | 0,03 | – | 0,09 |
| Mínimo | 0,001 | 0,004 | – | 0,03 |

LD(Pb) = 41,7 mg kg⁻¹ MS; n.a.: Não analisado; (*) Mendez e Maier (2008).

O mesmo tipo de análise pode ser estabelecido para os teores em As, Cu e Zn na urze; porém, será mais interessante considerar as relações existentes entre os metais e metalóides nas plantas e os respectivos teores no solo, nas diferentes frações analisadas. Para isso, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre esses valores: os teores em As, Cu e Zn nas plantas e os respectivos teores total, efetivamente biosponível e potencialmente biodisponível (Tabela 16).

Tabela 16. Coeficientes de correlação de Pearson calculados para os teores em As, Cu e Zn nas folhas de *E. andevalensis* e *C. ladanifer*, e os respetivos teores no solo nas diferentes frações (n = 18). As correlações marcadas são significativas com os seguintes níveis de significância: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

| Coeficientes de correlação de Pearson | | <i>E. andevalensis</i> | | | <i>C. ladanifer</i> | | |
|--|----|------------------------|--------|--------|---------------------|-------|---------|
| | | As | Cu | Zn | As | Cu | Zn |
| Metal total | As | 0,32 | 0,36 | 0,61** | 0,92*** | 0,31 | -0,33 |
| | Cu | 0,17 | 0,39 | 0,35 | -0,12 | 0,32 | 0,93*** |
| | Pb | 0,11 | 0,42 | 0,62** | 0,75*** | 0,1 | -0,44 |
| | Zn | 0,26 | 0,53* | 0,59** | 0,26 | 0,42 | 0,84*** |
| Teor na fracção efectivamente biodisponível | As | 0,29 | 0,35 | 0,55* | 0,64** | -0,01 | -0,32 |
| | Cu | 0,42 | 0,68** | 0,33 | -0,3 | -0,18 | 0,63** |
| | Pb | -0,21 | 0,3 | 0,2 | -0,2 | -0,36 | -0,27 |
| | Zn | -0,07 | 0,17 | 0,12 | -0,26 | 0,08 | -0,05 |
| Teor na fracção potencialmente biodisponível | As | 0,14 | 0,26 | 0,53* | 0,97*** | 0,24 | -0,35 |
| | Cu | -0,22 | -0,16 | 0,13 | 0,23 | 0,56* | 0,41 |
| | Pb | -0,22 | 0,29 | 0,25 | -0,1 | -0,28 | -0,28 |
| | Zn | -0,18 | -0,04 | 0,33 | 0,57* | 0,6 | 0,17 |

No caso da esteva (*C. ladanifer*), o As foi o único elemento para o qual foram encontradas correlações significativas entre os teores na planta e os teores desse elemento nas diferentes frações no solo: total, efetivamente biodisponível e potencialmente biodisponível. Isso indica que, apesar dessa planta não ter acumulado esse elemento, reage ao aumento da sua concentração no solo. O mesmo não pode ser dito relativamente ao comportamento da urze (*E. andevalensis*) relativamente a esse elemento.

O Zn foi o único elemento com coeficientes de correlação significativos entre o seu teor em ambas as plantas e o seu teor total no solo. Esse valor foi até bastante significativo ($r = 0,84$) no caso da esteva, o que não será alheio ao facto de ter sido a planta com FC mais elevados para esse elemento, respondendo de uma forma mais “indicadora” a esse elemento no solo.

No caso do Cu não foi possível obter um “padrão de comportamento” assinalável, tendo-se obtido um valor de correlação significativo entre o seu teor na esteva e o seu teor na fração potencialmente biodisponível ($r = 0,56$), e entre o seu teor na urze e o seu teor na fração efetivamente biodisponível ($r = 0,68$).

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi efetuado o estudo de solos provenientes da zona mineira de São Domingos, contaminados e não contaminados, tentando avaliar potenciais relações existentes entre os teores em metais totais, os teores em metais biodisponíveis, e a resposta ecotoxicológica de determinados organismos. Na caracterização dos solos foram utilizados parâmetros químicos, bioquímicos e ecotoxicológicos. Podem ser realçados os seguintes aspetos, já discutidos ao longo do trabalho:

- Os solos da Mina de São Domingos apresentam uma granulometria marcada por elementos grosseiros, sendo, na maioria dos locais de amostragem, classificados como de textura franco-arenosa. São, na sua maioria, solos ácidos, com elevada salinidade, reduzida capacidade de troca catiónica, com teores baixos em matéria orgânica e em macronutrientes principais.
- Porém, um dos locais de amostragem na Mina de São Domingos, L5, afastou-se deste padrão, apresentando um pH próximo da neutralidade, reduzida salinidade, teor em matéria orgânica e em nutrientes vegetais, e CTC, superiores aos valores apresentados pelos outros solos recolhidas na mina e, inclusive, superiores aos valores do local não-contaminado utilizado como referência (L6).
- Estes solos estão contaminados com As, Cu, Pb e Zn, uma vez que as suas concentrações totais ultrapassam os valores limites estabelecidos pelas Normas Canadenses para solos de uso industrial (CCME, 2006), utilizadas neste trabalho como referência.
- Nalguns locais, e para alguns elementos, os teores desses elementos encontrados na fração potencialmente biodisponível foram igualmente elevados, excedendo o valor de referência.
- Duma forma geral, os teores dos diferentes elementos na fração efetivamente biodisponível foram baixos: menos de 1% do total para o As, Cu e Pb, e menos de 10% do total no caso do Zn.
- O solo do local L5, que se evidenciou por apresentar as melhores características de todos os locais em termos nutricionais, é o que mais se destaca em termos da contaminação por metais, avaliada através dos seus teores totais. Porém, o valor de pH próximo da neutralidade desse solo, em conjugação com o facto de ser o solo com maior teor em matéria orgânica e com maior CTC, pareceram exercer um efeito muito

importante na imobilização dos elementos analisados: apesar dos seus teores totais serem muito elevadas, os seus teores na fração efetivamente biodisponível são relativamente pequenos, quando comparados com os valores encontrados nos outros locais.

- Embora não tenha sido detetada toxicidade nestes solos utilizando o ensaio de mortalidade com *E. fetida*, o mesmo não aconteceu utilizando o ensaio de reprodução com o mesmo organismo; verificou-se um estímulo na sua reprodução quando exposta ao solo do local L5, e uma inibição da reprodução em organismos expostos aos restantes solos. O maior efeito de inibição de reprodução foi registado no solo do local L4, com um valor de LOEC de 25% (m/m) e de EC₅₀ de 4% (m/m).
- Nos ensaios de germinação com *L. sativa*, para as mesmas concentrações de solo, verificou-se uma resposta tóxica semelhante para os solos provenientes dos locais L1 e L3, continuando a ser o solo do local L4 a provocar a maior resposta tóxica neste bioensaio, logo seguido do solo do local L2. Este bioensaio confirmou a “melhor qualidade” do solo amostrado no local L5, não tendo sido possível ter uma resposta tóxica quantificável utilizando este bioensaio para o solo deste local.
- De uma maneira geral, os solos amostrados na zona da Mina de São Domingos apresentam atividades enzimáticas baixas, por vezes com valores abaixo do limite de deteção da técnica, tendo acontecido o mesmo para a amostra controlo (L6), por ser um solo característico de uma área de solos “pobres” em matéria orgânica e em elementos essenciais. Considerando a atividade da desidrogenase, que pode ser considerada como um indicador de atividade microbiana global, o valor mais elevado foi encontrado no solo do local L5, seguido do local L6. As atividades enzimáticas da β-glucosidase e da fosfatase ácida foram superiores na amostra de solo do local L5, evidenciando uma elevada influência do teor em matéria orgânica de um solo, mais que o seu teor em metais potencialmente tóxicos, na resposta do bioensaio.
- De um modo geral, foram encontradas correlações significativas entre os teores bioacumulados de As, Cu, Pb e Zn e os teores dos mesmos elementos na fração mobilizável/potencialmente biodisponível. Como consequência deste facto, pode considerar-se que a avaliação da biodisponibilidade pelo método químico da extracção com solução 0,5 M em NH₄CH₃COO, 0,5 M em CH₃COOH e 0,02M em EDTA, pH 4,7, que extrai a fração dita mobilizável ou potencialmente biodisponível, é apropriada para avaliar a biodisponibilidade ambiental de As, Cu, Pb e Zn para a *E. fetida*.

- Porém, de acordo com os resultados obtidos, a resposta tóxica (biodisponibilidade toxicológica), não foi a esperada considerando os resultados da biodisponibilidade de metais utilizando os ensaios químicos, nem considerando os resultados da bioacumulação - a reprodução da *E. fetida* bem como a germinação de *L. sativa* foram maiores no solo do local L5, justamente o local onde a biodisponibilidade ambiental dos elementos analisados foi maior, e onde os valores de bioacumulação foram, também, maiores.
- Tanto a esteva como a urze que crescem na zona da Mina de São Domingos, apresentam um teor em As, Cu, Pb e Zn abaixo do limite de toxicidade em plantas para consumo animal (Mendez e Maier, 2008). Por isso, o risco de entrada desse elemento na cadeia alimentar por consumo dessas plantas por algum organismo selvagem é muito reduzido.
- Os valores dos FC calculados para o As, Cu e Zn foram <1 para ambas as plantas, indicando que elas não acumulam esses metais. Podemos concluir que estas plantas podem ser utilizadas em estratégias de fitoestabilização de solos de minas abandonadas, semelhantes a São Domingos (FPI).

Concluindo, ficou claro que a avaliação dos riscos ambientais com base na concentração total de um contaminante, pode superestimar riscos, visto que os organismos respondem apenas à fração do contaminante que se encontra biodisponível. Porém, essa avaliação de qual a “fração do contaminante que se encontra biodisponível” é muito difícil de conseguir, ou melhor, é muito difícil de estabelecer uma “receita”, adaptada a todo o tipo de situações, que nos permita avaliar essa biodisponibilidade. Essas “receitas” terão que ser escolhidas quase “caso a caso”. Neste trabalho ficou demonstrado que, embora a biodisponibilidade ambiental para um determinado organismo possa ser, de certa forma, prevista através de uma extração química, como foi o caso da que se fez utilizando uma solução 0,5 M em $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 0,5 M em CH_3COOH e 0,02M em EDTA, pH 4,7, tendo-se encontrado valores de concentração de elementos químicos potencialmente biodisponíveis que se correlacionaram com os teores bioacumulados pela *E. fetida*, a resposta tóxica (biodisponibilidade toxicológica), não foi a esperada.

De facto, todas as respostas obtidas nos diferentes bioensaios nos permitem observar que houve uma influência muito grande de outras características do solo, que não o seu teor em metais totais e/ou biodisponíveis, (e.g. pH, teor em matéria orgânica, teor em macronutrientes essenciais, CTC), na resposta toxicológica, tornando bastante difícil o

estabelecimento de uma relação entre a biodisponibilidade ambiental e a biodisponibilidade toxicológica.

Por esse facto, quando se avalia o risco em solos provenientes de locais com uma contaminação antropogénica mais complexa, com vários tipos de contaminantes, em solos com características físico-químicas distintas de local para local (*e.g.* teor e tipo de argila, pH, teor em matéria orgânica, teor em macronutrientes essenciais, CTC), que exercem uma influência muito grande na resposta tóxica, devem ser utilizados bioensaios na avaliação desse risco, só eles nos permitem ter uma visão holística mais significativa dos riscos de locais contaminados.

9. BIBLIOGRAFIA

- Adriano, D. C., Wenzel, W. W., Vangronsveld, J., Bolan, N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* **122**: 121-142.
- Alef, K., Nannipieri, P., Trazar-Cepeda, C. (1995). Phosphatase activity. In "Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry" (K. Alef and P. Nannipieri, eds.), pp. 335-344. Academic Press, London.
- Alef, K., Nannipieri, P. (1995a). β -Glucosidase activity. In "Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry" (K. Alef and P. Nannipieri, eds.), pp. 350-352. Academic Press, London.
- Alloway, B. J. (1995). Soil processes and the behaviour of metals. In "Heavy Metals in Soils" (B. J. Alloway, ed.), pp. 9-37. Blakie Academic & Professional, Glasgow.
- Alvarenga, P. (1997). *Estudo da transferência de metais no sistema solo-planta na zona mineira de Aljustrel aplicados à esteva (Cistus ladanifer L.)*. Tese de Mestrado, Universidade de Évora. Évora. 164 pp.
- Alvarenga, P., Araújo, F., Silva, J. (1998). As plantas, os solos, os metais e a vida – Jogos Múltiplos. *Soquímica* **71**:13-14.
- Alvarenga, P.M., Araújo, M.F., Silva, L. (2004). Elemental uptake and root-leaves transfer in *Cistus ladanifer* L. growing in a contaminated mining area (Aljustrel-Portugal). *Water, Air and Soil Pollution* **152**: 81-86.
- Alvarenga, P. (2007). Manual de apoio para as aulas teóricas de poluição e descontaminação de solos. Escola Superior Agrária de Beja. Beja.
- Alvarenga, P. (2009). *Utilização de Resíduos Orgânicos Biodegradáveis na Remediação de Solos Degradados por Atividades Mineiras*. Tese de Doutoramento em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. 15-99 pp.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Cunha-Queda, A.C. (2009). Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (II) effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. *Chemosphere* **74**: 1301-1308.
- Alvarenga, P. (2010). 3ª Parte: Avaliação da qualidade do solo - Protecção e Reabilitação de Solos. Escola Superior Agrária de Beja. Beja.
- Alvarenga, P. (2011). Método de determinação do teor em fósforo e potássio “assimiláveis”. Método Interno. Escola Superior Agrária de Beja. Beja.

- Alvarenga, P. (2011a). Método de determinação do azoto total. Método Interno. Escola Superior Agrária de Beja. Beja.
- Alvarenga, P. (2011b). Método de determinação do doseamento em metais totais – digestão com água régia. Método Interno. Escola Superior Agrária de Beja. Beja.
- Alvarenga, P. (2011c). Método de digestão de amostras de plantas para a determinação dos metais totais. Método Interno. Escola Superior Agrária de Beja. Beja.
- Alvarez-Valero, A.M., Pérez-López, R., Matos, J.X., Capitán, M.A., Nieto, J.M., Sáez, R., Delgado, J., Carballo, M. (2008). Potential environmental impact at São Domingos mining district (Iberian Pyrite Belt, South Western Iberian Peninsula): evidence from a chemical and mineralogical characterization. *Environmental Geology* **55**: 1797-1809.
- Amorim, cM.J.B., Novais, S., Römbke, J., Soares, A.M.V.M. (2008). Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): effects of different exposure time and soil properties. *Environmental Pollution* **155**: 112-116.
- Aparício, A. (1995). Seed germination of *Erica andevalensis* (Ericaceae), endangered edaphic endemic in Southwestern Spain. *Seed Science Technology* **23**:705-713.
- Bääth, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution* **47**: 335-379.
- Bandick, A.K., Dick, R. P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* **31**:1471-1479.
- Batista, M. J. (2003). *Comportamento de elementos químicos no sistema rocha-solo-sedimentoplanta na Área Mineira de Neves Corvo: Implicações ambientais*. Tese de Doutoramento. Universidade de Aveiro, Aveiro. 150 pp.
- Barriga, F.J.A.S., Carvalho, D e Ribeiro, A. (1997). Introduction to the Iberian Pyrite Belt. SEG Neves Field Conference. *Guidebook Series* **27**: 1-20.
- Brady, N.C. (1990). *The nature and properties of soil*. 10ª edição, Macmillan Pub. Nova Iorque.
- Bellaloui, A., Chtaini, A., Ballivy, G., Narasiah, S. (1999). Laboratory investigation of the control of acid mine drainage using alkaline paper mill waste. *Water, Air and Soil Pollution* **111**: 57-73.
- Bergstrom, D. W., Monreal, C.M., King, D.J. (1998). Sensitivity of soil enzyme activities to conservative practices. *Soil Science Society of America Journal* **62**:1286-1294.
- Biblioteca Digital Jurídica (2011). Acedido em 04 de Setembro de 2011, em https://bdjur.almedina.net/register.php?jump=%2Fcititem.php%3Ffield%3Dnode_id%26value%3D1191552.

- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., Schoeters, G. (1998). Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* **37**: 2935-2947.
- Carvalho, D. (1971). Jazigos de Fe-Mn da região Cercal- Odemira. Mina de S. Domingos. *Principais Jazigos Minerais do Sul de Portugal*, Livro-Guia nº4, 59-73 pp.
- Carvalho, R. (2009). *Património Industrial e Valorização do Território A Mina de São Domingos*. Tese de Mestrado em Ordenamento do Território e Planeamento Ambiental. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 10-16pp.
- Chan, G. Y. S., Ye, Z. H., Wong, M. H. (2003). Comparison of four *Sesbania* species to remediate Pb/Zn and Cu mine tailings. *Environmental Management* **32**: 246-251.
- Chander, K., Brookes, P. C. (1991). Is the dehydrogenase activity invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils?. *Soil Biology & Biochemistry* **23**: 909-915.
- Crawford, G.A. (1995). Environmental improvements by the mining industry in the Sudbury Basin of Canada. *Journ. Geoch. Explorat* **52**: 267-284.
- CCME. (2006). Canadian Environmental Quality Guidelines: Chapter 7. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Canadian Council of Ministers of the Environment. Acedido em 17 de Julho 2011, em: http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html?category_id=124.
- Conder, J. M., Lanno, R. P., Basta, N. T. (2001). Assessment of metal availability in smelter soil using earthworms and chemical extractions. *Journal of Environmental Quality* **30**: 2001.
- Conder, J.M., Seals, L.D., Lanno, R.P. (2002). Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* **49**:1-7.
- Constituição da República Portuguesa. (2005). VII Revisão Constitucional. Acedido a 04 de Setembro de 2011 ,em: <http://www.parlamento.pt/Legislacao/Paginas/ConstituicaoRepubblicaPortuguesa.aspx>.
- Crouau, Y., Chenon, P., Gisclard, C. (1999). The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Applied Soil Ecology* **12**: 103-111.
- Custódio, J. (1996). Sistemas de Lavra na Mina de S. Domingos (1854-1966). *Mineração no Baixo Alentejo*. Câmara Municipal de Castro Verde, Castro Verde.

- Custódio, J. (2002). Os Primórdios da Mina (Estudo para servir de fundamento a uma reconstituição da arqueologia mineira da Serra de S. Domingos). *Mineração do Baixo Alentejo*. Vol. II, Câmara Municipal de Castro Verde. Castro Verde.
- Decreto- Lei nº 90/90 de 1990, estabelece o regime jurídico de revelação e aproveitamento dos recursos geológicos (Lei das Minas), Diário da República nº 63, Série I de 16 de Março. Ministério da Indústria e Energia. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 198-A de 2001, estabelece o regime jurídico da atividade de recuperação ambiental das áreas mineiras degradadas, Diário da República nº155, Série I-A de 6 de Julho. Ministério da Ecónomia. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 276 de 2009, estabelece o regime jurídico da utilização agrícola das lamas de depuração, Diário da República nº 192, Série I de 2 de Outubro. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.
- Dick, R.P e Bandick, A. K. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* **31**: 1471-1479.
- DIN 38414-S4 (1984). Determination of leachability by water (S4). German standard methods for the examination of water, waste water and sludge. Sludge and Sediments (group S). Method DIN 38414-S4.
- Domingues, H. (1999). *Comportamento de Metais Pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn) em Solos Tratados com Lamas Residuais Urbanas*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa. 283 pp.
- Dorn, P. B., Vipond, T. E., Salanitro, J. P., Wisniewski, H. L. (1998). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox(R), and plants. *Chemosphere* **37**: 845-860.
- Eivazi, F., Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* **20**: 601-606.
- Evangelou, V. P., Zhang, Y. L. (1995). A review: pyrite oxidation mechanisms and acid mine drainage prevention. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **25**: 141-199.
- EXMIN (2003). Estudo Director de Sulfuretos Polimetálicos Maciços. Relatório Técnico, 11 Vol., Lisboa.
- FAO (1995). Planning for sustainable use of land resources. Towards a new approach, *FAO Land and Water Bulletin* Nº 2, Food and Land Organization of the United Nations (FAO), Land and Water Development Division, Rome. Acedido a 26/12/2007 em: <http://www.fao.org/docrep/V8047E/v8047e00.htm#Contents>.

- Fragoso, C., P, Lavelle., E, Blanchart., B. K., Senapati, J. J., Jiménez, M. A., Martínez, T., Decaëns., J, Tondoh. (1999). Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. *In: P. Lavelle, L. Brussaard and P.F. Hendrix (Eds). Earthworm management in tropical agroecosystems. CABI, Wallingford. 27-55 pp.*
- Garcia, C., Hernandez, T., Roldan, A., Martin, A. (2002). Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 635-642.
- Grenway, H e Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 149–190.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 877-887.
- Guita, R. (2011). A Mina de São Domingos (Mértola, Baixo Alentejo, Portugal): actividade industrial moderna (1854-1966). *Mina de São Domingos, Mértola. 5-7pp.*
- Gomes, M. P., Silva A. A. (1962). *Um novo diagrama triangular para a classificação básica da textura do solo*. Vol. 10, nº 1, Garcia de Ortu. Ciência dos solos.
- Gonçalves, A. (2010). Impactes Ambientais Em Áreas Mineiras Activas – O Caso da Ribeira do Bodelhão Minas da Panasqueira. *VI Seminário Latino-Americano de Geografia Física e II Seminário Ibero-Americano de Geografia Física*. Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Gupta, S. K., Vollmer, M. K., Krebs, R. (1996). The importance of mobile, mobilizável and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *The Science of the Total Environment* **178**: 11-20.
- Hammer, D., Keller, C. (2002). Changes in the rhizosphere of metal-accumulating plants evidenced by chemical extractants. *Journal of Environmental Quality* **31**: 1561-1569.
- Harmsen, J. (2007). Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* **36**: 1420-1428.
- Hinojosa, M. B., García-Ruíz, R., Viñegla, B., Carreira, J. A. (2004). Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 1637-1644.
- Hodson, M. E., Valsami-Jones, E., Cotter-Howells, J. D., Dubbin, W. E., Kemp, A. J., Thornton, I., Warren, A. (2001). Effect of bone meal (calcium phosphate) amendments

- on metal release from contaminated soils - a leaching study. *Environmental Pollution* **112**: 233-243.
- Houba, V.J.G., Lexmond, T.M., Novozamsky, I., van der Lee, J.J. (1996). State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *The Science of the Total Environment* **178**: 21-28.
- Huang, Q., Shindo, H. (2000). Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. *Soil Biology & Biochemistry* **32**: 1885-1892.
- Hursthouse, A. S. (2001). The relevance of speciation in the remediation of soils and sediments contaminated by metallic elements - an overview and examples from the Central Scotland, UK. *Journal of Environmental Monitoring* **3**: 49-60.
- Ingham, E. R. (2006). *The soil biology primer*. Acedido em 17 de Julho de 2011, em: http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil_biology/fw&soilhealth.html.
- ISO 11074 (2004). Soil Quality - Vocabulary. International Organization for Standardization. Geneva – Switzerland.
- ISO 11267 (1999). Soil Quality - Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 11268-1 (1998). Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of Acute Toxicity Using Artificial Soil Substrate. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 11268-2 (1998). Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of Effects on Reproduction. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 11269-1 (1993). Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora- Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 11269-2 (1995). Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora- Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence of Higher Plants. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 11466 (1995). Soil Quality - Extraction of Trace Elements Soluble in Aqua Regia. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 14238 (1997). Soil Quality - Biological Methods - Determination of Nitrogen Mineralization and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on These Processes. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.

- ISO 14240-1 (1997). Soil Quality - Determination of Soil Microbial Biomass - Part 1: Substrate-Induced Respiration Method. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 14240-2 (1997). Soil Quality - Determination of Soil Microbial Biomass - Part 2: Fumigation-Extraction Method. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 15685 (2004). Soil quality - Determination of Potential Nitrification and Inhibition of Nitrification - Rapid Test by Ammonium Oxidation. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 16387 (2004). Soil Quality - Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) Determination of Effects on Reproduction and Survival. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 17512-1 (2008). Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 23753-1 (2002). Draft (Enquiry Stage). Soil Quality - Determination of Dehydrogenase Activity in Soils- Part 1: Method with TTC. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 15799 (1999). Soil Quality – Guidance on the Ecotoxicological Characterization of Soils and Soil Materials. Annex A.1.2.2 Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 17126 (2004). Soil Quality - Determination Of The Effects Of Pollutants On Soil Flora - Screening Test For Emergence Of Lettuce Seedlings (*Lactuca sativa* L.). . International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 17402 (2006). Soil quality - Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability in soil and soil materials. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 17512 (2003). Soil Quality - Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals – Test with Earthworms (*Eisenia fetida*). International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO/TS 21268-1 (2007). Soil Quality – Leaching Procedures for Subsequent Chemical and Ecotoxicological Testing of Soil and Soil Materials – Part 1: Batch Test Using a Liquid

- to Soil Ratio of 2 L/kg Dry Matter. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO/TS 21268-2 (2007). Soil Quality – Leaching Procedures for Subsequent Chemical and Ecotoxicological Testing of Soil and Soil Materials – Part 2: Batch Test Using a Liquid to Soil Ratio of 10 L/kg Dry Matter. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO/TS 21268-3 (2007). Soil Quality – Leaching Procedures for Subsequent Chemical and Ecotoxicological Testing of Soil and Soil Materials – Part 3: Up-Flow Percolation test. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- ISO/TS 21268-4 (2007). Soil Quality – Leaching Procedures for Subsequent Chemical and Ecotoxicological Testing of Soil and Soil Materials – Part 4: Influence of pH on Leaching with Initial Acid/Base Addition. International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland.
- Izquierdo, I., Caravaca, F., Alguacil, M.M., Hernández, G., Roldán, A. (2005). Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Applied Soil Ecology* **30**: 3-10.
- Johnson, D. B. (2003). Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at the abandoned coal and metal mines. *Water, Air and Soil Pollution* **3**: 47-66.
- Kandeler, E., Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* **6**: 68-72.
- Kapustka, L. A., Reporter, M. (1993). Terrestrial primary producers. In “*Handbook of Ecotoxicology*” (P. Calow, ed), pp. 278-298. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Kızılkaya, R., Askın, T., Bayraklı, B., Sağlam, M. (2004). Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology* **40**: 95-102.
- Kunito, T., Saeki, K., Goto, S., Hayashi, H., Oyaizu, H., Matsumoto, S. (2001). Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresource Technology* **79**: 135-146.
- Kuperman, R. G., Carreiro, M. M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* **29**: 179-190.
- Lee, I.S., Kim, O. K., Chang, Y.-Y., Bae, B., Kim, H. H., Baek, K. H. (2002). Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean shooting range. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**: 406-411.

- Lee, J.J., Park, R.D., Kim, Y.W., Shim, J. H., Chae, D.H., Rim, Y.S., Sohn, B. K., Kim, T.H., Kim, K.Y. (2004). Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. *Bioresource Technology* **93**: 21-28.
- Lei nº 11/87 (1987). Lei de Bases do Ambiente, Diário da República nº81/87, Série I de 7 de Abril. Assembleia da República.
- Lock, K., Janssen, C. R. (2003). Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere* **53**: 851-856.
- Loureiro, S. (2004). Ecotoxicity Assessment of Soils: a Case Study from Mina de Jales. PhD Thesis, Universidade de Aveiro, Aveiro. 176 pp.
- Macías, J. A. P. (1999). *Cerro Salomón y la Minería Hispanomusulmana en Garb-al-Andalus*, *Arqueologia Medieval*, nº6, Porto, Editorial. Afrontamento/Campo Arqueológico de Mértola, pp. 19-37.
- Malavé, J. e Bedia, J. (1991). Relatório Final de Trabalhos Realizados na Área de S. Domingos (1990-91). CONASA, Arq. Técnico INETI, 110 pp.
- Martins, J. (2005). Recuperação Ambiental da Área Mineira de Aljustrel. In "III Encontro das Comunidades Mineiras" (C. M. de Aljustrel, ed.). Câmara Municipal de Aljustrel, Aljustrel.
- Matos, J.X. e Rosa, C. (2001). Diagnóstico Preliminar de Minas Abandonadas/Área Sul. Rel. Int. IGM, 276 pp.
- Matos, J.X., Oliveira, V., Alves, H., Carvalho, R. (2002). Património geológico-mineiro e histórico da Mina de S. Domingos, Faixa Piritosa. Congresso Património Geológico-Mineiro, IGM/SEDPGYM, Beja. 517-535, pp.
- Matos, J.X. e Martins, L. (2003). Itinerários geo- ecoeducacionais como factor de desenvolvimento sustentado do turismo temático associado à Faixa Piritosa Ibérica. Abst. *IV Congresso Internacional Património Geológico y Minero*, SEDPGYM, Utrillas, Espanha. 539-557 pp.
- Matos, J.X. e Oliveira, V. (2003). *Mina do Lousal (Faixa Piritosa Ibérica) - Percorso geológico e mineiro pelas cortas e galerias da antiga mina*. IGME, Pub. Museo Geominero, nº2, 117-128 pp.
- Matos, J.X. (2004). *Carta geológica e mineira da Mina de S. Domingos esc. 1/5000*, IGM.
- Matos, J.X. e Martins, L. (2004). Sustentabilidade da mineração de minérios metálicos na Faixa Piritosa Ibérica. Abst. *Seminário Iberoamericano La Minería Dentro Del*

- Ordenamiento Territorial, Santo Domingo*, Rep. Dominicana, CYTED, Dir. General de Minería, 9 pp.
- Matos, J.X. (2005). Percursos Geo-educacionais na Faixa Piritosa Ibérica, um contributo para a valorização do património geológico e mineiro português. Abst. *III Enc. Com. Mineiras de Aljustrel*, CM Aljustrel.
- Matos, J. X. e Martins, L. P. (2006). Reabilitação ambiental de áreas mineiras do sector português da Faixa Piritosa Ibérica: estado da arte e prespectivas futuras. *Boletín Geológico y Minero* **117** (2): 289-304.
- Matsuoka, M. (2006). *Atributos biológicos de solos cultivados com videira na região da Serra Gaúcha*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 171pp.
- Mendes, I.C., Vivaldi, L.A. (2001). Dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob Mata de Galeria na região do Distrito Federal. In: “*Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*”. (Ribeiro, J.F.; Fonseca, C.L.; Souza-Silva, J.C. eds.). Planaltina, Embrapa Cerrados.
- Mendez, M. O. e Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* **116**: 278-283.
- Merturis. (2011). Acedido a 09 de Setembro de 2011, em: <http://www.merturis.pt/pt/inicio/index.php>.
- Monreal, C.M., Bergstrom, D.W. (2000). Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. *Canadian Journal of Soil Science, Ottawa* **80**, 419-428.
- Nielson, R.A., Peterson, H.B. (1972). Treatment of Mine Tailings to Promote Vegetative Stabilisation. Agricultural Experiment Station, Logan, Utah, Bulletin 485.
- OECD 207 (1984). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 2: Effects on Biotic Systems*. Test N°. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests.
- OECD 222 (2004). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 2: Effects on Biotic Systems*. Test N°. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).
- Oliveira, J.T. e Oliveira, V. (1996). *Síntese da Geologia da Faixa Piritosa, em Portugal, e das Principais Mineralizações Associadas. Mineração no Baixo Alentejo*, Câmara Municipal de Castro Verde: 8-27 pp.

- Oliveira, J.S. (1997). Algumas reflexões com enfoque na problemática dos riscos ambientais associados à atividade mineira. *Est. Not. Trab. IGM*, t. 39, 3-26 pp.
- Oliveira, V., Matos, J.X., Bengala, M., Sousa, P. (1998). Principais alinhamentos vulcânicos a norte da Falha de Grândola, sob formações da Bacia Terciária do Sado e sua potencialidade mineira no contexto da Faixa Piritosa Ibérica. *Actas V Cong. Nac. Geologia*, Com. IGM, 15-18 pp.
- Oliveira, M.L.F. e Matos, J.X. (2002). The exploitation of copper ores and the settlements of Estremadura and south of Portugal during the calcolithic. *Ciências Históricas*, Universidade Portucalense, Porto, 123-138 pp.
- Oliveira, J.S., Farinha, J., Matos, J.X., Ávila, P., Rosa, C., Machado, M., Daniel, F., Martins, L. e Leite, M. (2002). Diagnóstico Ambiental Principais Áreas Mineiras Degradadas País. *Bol. Minas IGM* 39-2, 67-85 pp.
- Oliveira, J.T. e Matos, J.X. (2004). O caminho de ferro da Mina de S. Domingos ao Pomarão: um percurso geoeeducacional na Faixa Piritosa Ibérica. *XXIV Enc. Prof. Geociências APG*, Beja, 19 pp.
- Pé-Curto, A., Matos, J.X., Vasconcelos, J., Cebola, P. e Felgueiras, S. (2002). Património Geológico da Mina do Bugalho – Valorização do seu Passado Histórico-Mineiro. In Brandão, Pictel, J. R., Dick, W. A., Sutton, P. (1994). Comparison of amendments and management practices for long-term reclamation of abandoned mine land. *Journal of Environmental Quality* **23**: 766-772.
- Pereira, R., Sousa, J.P., Ribeiro, R., Gonçalves, F. (2006). Microbial indicators in mine soils (S. Domingos Mine, Portugal). *Soil & Sediment Contamination* **15**: 147-167.
- Pérez-de-Mora, A., Ortega-Calvo, J. J., Cabrera, F., Madejón, E. (2005). Changes in enzyme activities and microbial biomass after "in situ" remediation of heavy metalcontaminated soil. *Applied Soil Ecology* **28**: 125-137.
- Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaekel, P., Schloter, M. (2006). Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 327-341.
- Pictel, J. R., Dick, W. A., Sutton, P. (1994). Comparison of amendments and management practices for long-term reclamation of abandoned mine land. *Journal of Environmental Quality* **23**: 766-772.
- Phillips, T., Liu, D., Seech, A. G., Lee, H., Trevors, J. T. (2000). Bioremediation in fiel box plots of a soil contaminated with wood-preservatives: a comparison of treatment

- conditions using toxicity testing as a monitoring technique. *Water, Air and Soil Pollution* **121**: 173-187.
- Pueyo, M., López-Sánchez, J.F., Rauret, G. (2004). Assessment of CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃ extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta* **504**: 217-226.
- Quental, L., Bourguignon, A., Sousa, A.J., Batista, M.J., Brito, M.J., Tavares, M.T., Abreu, M.M., Vairinho, M., Cottard, F. (2002). MINEO Southern Europe Environment Test Site Contamination/Impact Mapping and Modelling - Final Report. Acedido em 18 de Julho de 2011, em: http://www2.brgm.fr/mineo/SiteReport/IGM_FinalReport.pdf.
- Queiroz, N., Pereira, F., Bengala, J., Moreira, J., Freire, J., Viegas, L., Viana, M., Gaspar, O., Pereira, V. e Borralho, V. (1989). *Est. Not. Trabalhos SFM*, T. 50º Aniversário, Porto.
- Quelhas dos Santos, J. (1996). Fertilização – Fundamentos da Utilização dos Adubos e Correctivos. 2ª edição. Publicações Europa-América.
- Reinecke, A. J. e Reinecke, S. A. (2004). Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. In “*Earthworm ecology*” (C.A. Edwards ed.), pp 299-320. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Renella, G., Ortigoza, A. L. R., Landi, L., Nannipieri (2003). Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity, on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED₅₀). *Soil Biology & Biochemistry* **35**: 1203-1210.
- Salomons, W., Förstner, U. (1984). "Metals in the Hydrocycle," Springer-Verlag, Berlin.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., Raskin, I. (1995). Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology* **13**: 468-474.
- Schmitz, J.A.K. (2003). *Indicadores biológicos de qualidade do solo*. Tese de Doutorado em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Sengupta, M. (1993). "Environmental Impacts of Mining, Monitoring, Restoration, and Control", Lewis Publishers, London.
- Silva, J.B. (1998). Enquadramento geodinâmico da Faixa Piritosa na Zona Sul Portuguesa. *Livro-Guia das excursões do V Congresso Nacional de Geologia*, IGM, 79-90 pp.
- Smith, R. A. H., Bradshaw, A. D. (1979). The use of metal tolerant plant populations for the reclamation of metalliferous wastes. *Journal of Applied Ecology* **16**: 595-612.
- Statsoft, Inc., (2001). Estatística 6.0 - Data Analysis Software System.
- Sutton, P., Dick, W. A. (1987). Reclamation of acidic mined lands in humid areas. *Advances in Agronomy* **41**: 377-406.

- Tabak, H. H., van Hullebush, E., Dejonghe, W. (2004). Bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides. In "EURO Summer School Conference- Trends in Remediation of Soils and Sediments", Wageningen University, The Netherlands.
- Tabatabai, M. A. (1982). Soil Enzymes. In "Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties" (A. L. Page, D. E. Baker, E. Rosco, J. Ellis, D. R. Keeney, R. H. Miller and J. D. Rhoades, eds.), pp. 903-947. American Society of Agronomy, Inc. e Soil Science Society of America, Madison.
- Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* **1**: 301-307.
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil Enzymes. In "Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties" (S. H. Mickelson and J. M. Bigham, eds.), pp. 775-833. Soil Science Society of America, Inc.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S., Gil-Sotres, F. (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology & Biochemistry* **32**: 1867-1875.
- Tripathi, S.; Chakraborty, A.; Chakrabarti, K.; Bandyopadhyoy, B. K. (2007). Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 2840-2848.
- Tordoff, G. M., Baker, A. J. M., Willis, A. J. (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* **41**: 219-228.
- van Beelen, P., Doelman, P. (1997). Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* **34**: 445-499.
- van Straalen, N. M. (2002). Assessment of soil contamination - a functional perspective. *Biodegradation* **13**: 41-52.
- van Gestel, C. A. M., van der Waarde, J. J., Derksen, J. G.M., van der Hoek, E. E., Veul, M. F. X. W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., Stokman, G. N. M. (2001). The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (7): 1438-1449.
- Udovic, M., Lestan, D. (2010). *Eisenia fetida* avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. *Environmental Pollution* **158**: 2766-2772.
- Wild, A. (1993). Soil and the Environment: An Introduction. Cambridge University Press, Cambridge.

- Williamson, A., Johnson, M. S. (1981). Reclamation of metalliferous mine wastes. *In* "Effect of Heavy Metal Pollution on Plants, Vol. 2. Metals in the Environment" (N. W. Lepp, ed.), pp. 185-212. Applied Science Publishers Ltd., Barking.
- Wong, M. H. (2003). Ecological restoration of degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* **50**: 775-780.
- Ye, Z. H., Shu, W. S., Zhang, Z. Q., Lan, C. Y., Wong, M. H. (2002). Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques. *Chemosphere* **47**: 1103-1111.