



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

QUALIDADE DA ÁGUA NAS ZONAS DE ABEBERAMENTO NA ÁREA DE
REINTRODUÇÃO DO LINCE IBÉRICO (*LYNX PARDINUS*) EM PORTUGAL: ESTUDO
PRELIMINAR SOBRE A PRESENÇA DE CÁDMIO, CHUMBO, FERRO, COBRE E ZINCO

CLÁUDIA FILIPA VELHO ALMEIDA SANTOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates
Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá Henriques
Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

ORIENTADOR

Mestre Rodrigo Calado da Cunha
Serra

CO-ORIENTADORA

Doutora Anabela Santos Moreira

2019
Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

QUALIDADE DA ÁGUA NAS ZONAS DE ABEBERAMENTO NA ÁREA DE
REINTRODUÇÃO DO LINCE IBÉRICO (*LYNX PARDINUS*) EM PORTUGAL: ESTUDO
PRELIMINAR SOBRE A PRESENÇA DE CÁDMIO, CHUMBO, FERRO, COBRE E ZINCO

CLÁUDIA FILIPA VELHO ALMEIDA SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá Henriques

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

ORIENTADOR

Mestre Rodrigo Calado da Cunha

Serra

CO-ORIENTADORA

Doutora Anabela Santos Moreira

2019

Lisboa

*Aos que foram inspiração
Para entrar nesta luta insana
Entre a sobrevivência e a extinção
Aos que não têm voz
Calabacin, Malva e Oriana*

Agradecimentos

Ao Mestre Rodrigo Serra, pela oportunidade que me proporcionou ao receber-me no CNRLI, onde descobri e aprendi sobre estes pequenos grandes felinos e pelo apoio durante este percurso, um sincero obrigado.

Obrigado à FMV-ULisboa, a minha casa académica, e, em especial, à Doutora Anabela Santos pelo trabalho dedicado e orientação valiosa na realização desta dissertação.

À equipa do ICNF, ao Diretor Pedro Rocha, aos Vigilantes da Natureza, David Carvalho e Fernando Romba, ao biólogo Carlos Carrapato e, em especial, ao Doutor Pedro Sarmento, agradeço pelo acompanhamento e apoio, crucial na realização deste projeto, e que me mostrou um pouco da vida e beleza guardadas no Vale do Guadiana.

Gostaria também de agradecer à Eng^a Marisa Viriato e Dr^a Sílvia Ferreira das Águas do Algarve pela partilha de conhecimentos importantes numa fase inicial do projeto.

No CNRLI encontrei uma segunda casa e família e é com especial carinho que agradeço a estas pessoas incríveis: Sílvia, Amil, Miguel, Marta Cabaça, Joana, João, Marta Horta, Isabel, Vanessa, Jan, Lopes, Andreia, Suzana, André, Maria e Laura e, como não podia deixar de ser, aos “meus” lince, Olívia, Flora, Madagáscar, Biznaga, Drago, Era, Fado, Jabaluna, Jerte, Foco, Fresa, Hermes, Artemisa, Enebro, Mouro, Magreb, Calabacin, Juncia, Fresco, Kaida, Fruta, Jurumenha, K5.

Agradeço a toda a equipa da Veterarq, especialmente ao Dr. David Passos com quem tive a oportunidade de ser *minivet*, aprender e crescer nestes últimos anos.

E porque não se chega a lado nenhum sozinho, um obrigado enorme ao Gonçalo, Tita, Claudinha, Mariana, Catarina, Zé, Marta, que me aturam todos estes anos, nos bons e maus momentos, e que ocupam um lugar muito importante no meu coração. Ao Ivan, meu companheiro de aventuras, obrigada por tudo. Por teres estado sempre ao meu lado, por me acompanhares nos meus momentos de triunfo, pela inacreditável paciência nos meus picos de stress em épocas de exame, pelo amor, carinho e amizade.

À Íris, à Leia, à Nira, à Jade, à Nikita e à Oriana, meus amores, que me inspiram todos os dias a dedicar a minha vida aos patudos deste mundo.

E porque ser veterinária não foi uma viagem de sete anos, mas sim um sonho de pequenina, um obrigado de coração cheio à minha família, a quem devo quem sou, às minhas avós, à minha tia Zezinha, à minha irmã Mariana e, acima de tudo, ao meu Pai e à minha Mãe, pelo apoio incondicional e pela paciência. Obrigada me ajudarem a tornar este sonho realidade.

QUALIDADE DA ÁGUA NAS ZONAS DE ABEBERAMENTO NA ÁREA DE REINTRODUÇÃO DO LINCE IBÉRICO (*LYNX PARDINUS*) EM PORTUGAL: ESTUDO PRELIMINAR SOBRE A PRESENÇA DE CÁDMIO, CHUMBO, FERRO, COBRE E ZINCO

Resumo

O lince ibérico (*Lynx pardinus*) é uma espécie endémica da Península Ibérica que, após o declínio da sua população nos últimos dois séculos, se aproximou perigosamente da extinção, chegando mesmo a ser considerado extinto em Portugal. Este cenário tem vindo a ser contrariado graças à ação conjunta de Portugal e Espanha, através da aplicação de medidas de conservação *ex-situ* e *in-situ*, estando atualmente a espécie classificada como “Ameaçada” pela IUCN/SSC (*International Union for Conservation of Nature/ Species Survival Commission*).

Desde o início da sua reintrodução em Portugal, em 2015, no Parque Natural do Vale do Guadiana, poucos estudos foram realizados quer sobre a população atual, quer sobre a área ocupada. O objetivo deste estudo é realizar um estudo preliminar acerca da presença de cádmio (Cd), chumbo (Pb), ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn) através da análise de amostras de água doce de superfície, em pontos de abeberamento do lince ibérico em liberdade em Portugal.

A toxicidade dos metais, torna-os potencialmente perigosos, tendo em conta as consequências nefastas que podem causar na saúde dos seres vivos, uma preocupação acrescida quando se trata de predadores de topo, como é o caso do lince ibérico, devido à ocorrência de fenómenos de bioacumulação e biomagnificação.

Os resultados obtidos neste estudo preliminar mostram que a concentração de Cd, Pb e Zn e Cu se encontram abaixo dos limites de referência indicados para a água para consumo humano. As concentrações de Fe, embora acima do limite estipulado legalmente, podem ser consideradas aceitáveis.

Perante os resultados obtidos, a quantificação de metais, na água das zonas de abeberamento do lince ibérico, não parece constituir motivo de preocupação imediata, devendo estas determinações, no entanto, serem incluídas em futuros estudos de avaliação de risco ambiental.

Palavras-chave: *Lynx pardinus*, Lince Ibérico, Reintrodução, Metais Pesados, Toxicidade, Água

WATER QUALITY IN DRINKING SPOTS OF THE IBERIAN LYNX (*LYNX PARDINUS*)
REINTRODUCTION AREA IN PORTUGAL: PRELIMINARY STUDY ABOUT THE
PRESENCE OF CADMIUM, LEAD, IRON, COPPER AND ZINC

Abstract

The Iberian lynx (*Lynx pardinus*) is an endemic species of the Iberian Peninsula, in decline for the past two centuries, approaching dangerously of extinction, and even considered extinct in Portugal in the recent past. Combined efforts of Portugal and Spain, with the implementation of *ex-situ* and *in-situ* measures towards the conservation of this species, have been able to reverse this scenario. Currently, the species has the classification of “Endangered” by the IUCN/SSC (International Union for Conservation of Nature/ Species Survival Commission).

Since the reintroduction of the first individuals in Portugal, in 2015, in the Natural Park of the Guadiana Valley, few studies have been made, about either the current population, or the occupied area. The main goal of this study is to collect data to a preliminary study about the presence of cadmium (Cd), lead (Pb), copper (Cu), iron (Fe) and zinc (Zn), through the analyses of surface fresh water samples from drinking spots of free-ranging Iberian lynxes in Portugal.

The toxicity of metals makes them potentially dangerous, considering the negative consequences that this elements can have on the health and life of different organisms, a bigger concern in top predators like the Iberian Lynx, because of phenomena like bioaccumulation and biomagnification.

The results of this study show that the concentrations of Cd, Pb, Cu and Zn were under the reference values, when compared with drinking water guidelines for humans. The concentrations of Fe, although above the legal recommended value, can still be considered acceptable.

Based on the results of this study, the presence of metals in the water of the Iberian lynx drinking spots, seems to represent no immediate reason for concern, however, this parameter should be included in future studies of environmental risk assessment.

Keywords: *Lynx pardinus*, Iberian Lynx, Reintroduction, Heavy Metals, Toxicity, Water

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vi
Índice de Gráficos.....	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	vii
Descrição das Atividades Desenvolvidas no Estágio Curricular	1
1. Introdução.....	5
2. Revisão Bibliográfica	6
2.1. Lince Ibérico (<i>Lynx pardinus</i>)	6
2.1.1. Da Extinção à Reintrodução	7
2.1.2. Medidas de Conservação <i>Ex-situ</i>	8
2.1.3. Medidas de Conservação <i>In-situ</i>	9
2.1.4. Ameaças	10
2.2. Área de Reintrodução em Portugal	11
2.2.1. Fauna	12
2.2.2. Rede Hidrográfica.....	12
2.2.3. Clima	13
2.2.4. Solos	13
2.3. Faixa Piritosa Ibérica.....	13
2.4. Metais Pesados.....	15
2.4.1. Circulação dos Metais no Ambiente.....	16
2.4.2. Toxicidade e ecotoxicologia dos metais.....	16
2.4.3. Cádmio	18
2.4.4. Mercúrio	19
2.4.5. Chumbo.....	20
2.4.6. Arsénio	22
2.4.7. Cobre	23
2.4.8. Zinco	24
2.4.9. Selénio	25
2.4.10. Ferro.....	26

Qualidade da água nas zonas de abeberamento na área de reintrodução do lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>) em Portugal: estudo preliminar sobre a presença de cádmio, chumbo, ferro, cobre e zinco	27
3. Objetivos.....	27
4. Material e Métodos	27
5. Resultados.....	29
6. Discussão	38
7. Conclusão e Perspetivas Futuras	44
8. Bibliografia.....	45
Anexo I – Protocolo de Colheita e Conservação de amostras de Água para análise de Metais Pesados.....	52

Índice de Figuras

Figura 1:	Libertação em Mértola de um lince nascido no CNRLI.....	4
Figura 2:	Lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>) em liberdade em Portugal.....	6
Figura 3:	Distribuição das populações de lince ibérico em 2004 na Península Ibérica.....	8
Figura 4:	Distribuição das populações de lince ibérico em 2017.....	10
Figura 5:	Estatuto de proteção da área de intervenção do Plano de Gestão do Vale do Guadiana.....	11
Figura 6:	Ilustração da Faixa Piritosa Ibérica com representação dos principais focos de atividade mineira.....	14
Figura 7:	Ribeira de Oeiras, Mértola.....	29
Figura 8:	Representação geográfica dos pontos de colheita de amostras.....	30
Figura 9:	Latrina de coelho e lince ibérico, Mértola.....	31
Figura 10:	Processamento de uma amostra no campo.....	34
Figura 11:	Representação geográfica dos locais analisados e respetiva concentração de Fe (mg/L).....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1:	Valores de referência dos metais analisados	28
Tabela 2:	Amostras colhidas no mês de Maio de 2018.....	32
Tabela 3:	Amostras colhidas no mês de Junho de 2018.....	33
Tabela 4:	Limites de Quantificação dos elementos analisados	35
Tabela 5:	Valores de pH inicial, pH final, determinações químicas (Cd, Pb, Cu, Fe e Zn) nas amostras analisadas, valores médios aceitáveis e LQ	35

Índice de Gráficos

Gráfico 1:	Determinações químicas de ferro (mg/L) nos locais analisados.....	36
------------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AP:	Área Protegida
ARLI:	Área de Reintrodução do Lince Ibérico
As:	arsénio
ASS:	espetroscopia de absorção atómica
Ca:	cádmio
Cu:	cobre
CNRLI:	Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico
Fe:	ferro
FPI:	Faixa Piritosa Ibérica
GPS/GSM:	<i>Global Positioning System/ Global System for Mobile Communications</i>
Hg:	mercúrio
ICNF:	Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas
ICP:	Espectroscopia de Emissão em Plasma
IM:	Intramuscular
IUCN:	<i>International Union for Conservation of Nature / União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais</i>
LAIST:	Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico
LQ:	limite de quantificação
MeHg:	metilmercúrio
Ni:	níquel
Pb:	chumbo
PVC:	Policloreto de vinila
Se:	selénio
SC:	Subcutânea
SNC:	Sistema Nervoso Central
SSC:	<i>Species Survival Commission / Comissão de Sobrevivência das Espécies</i>
TGI:	Trato Gastrointestinal
USEPA:	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VHF:	<i>Very High Frequency</i>
WHO:	<i>World Health Organization</i>
Zn:	zinco
ZPE:	Zona de Proteção Especial

Descrição das Atividades Desenvolvidas no Estágio Curricular

O estágio curricular que deu origem a esta dissertação teve início a 4 de Setembro de 2017 e veio a terminar a 22 de Junho de 2018, inserindo-se no âmbito da área de Clínica, sob a orientação do Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra e coorientação da Doutora Anabela Santos Moreira. Este decorreu maioritariamente no Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico (CNRLI), em Silves, distrito de Faro, tendo sido também desenvolvidas atividades no campo, em Mértola e Serpa, Castro Verde e Almodôvar, distrito de Beja. As atividades desenvolvidas, descritas em seguida, podem enquadrar-se nas áreas de etologia, medicina veterinária e saídas de campo.

Etologia

Este estágio teve como principal componente a integração na equipa de etologia do CNRLI, cuja função é a videovigilância dos lince em cativeiro, de modo a acompanhar todas as etapas da sua vida e adquirir conhecimentos sobre comportamento animal, nomeadamente desta espécie. Esta equipa funciona 24 horas, 365 dias por ano, de modo a fazer um acompanhamento contínuo dos animais nos cercados, usando câmaras instaladas nos mesmos e minimizando assim o impacto da presença humana. Desta forma, foi possível acompanhar a rotina dos animais, o seu desenvolvimento e comportamento, detetar qualquer situação anómala que possa requerer intervenção por parte de tratadores ou veterinários, bem como assistir os tratadores durante o maneio diário dos animais. O contato com humanos é evitado, procurando sempre reproduzir em cativeiro, um ambiente próximo daquele que teriam em estado selvagem para criar animais aptos a ser reintroduzidos, não só a nível físico, como também comportamental.

Dependendo da altura do ano, existiram situações que exigem uma atenção particular por parte da equipa de videovigilância. De acordo com o tipo de atividades que decorre no CNRLI, podemos dividir o ano em quatro trimestres: de agosto a outubro destacou-se o Treino de Reintrodução das ninhadas, para que as crias nascidas nesse ano aprendessem as competências predatórias necessárias para o seu sucesso em liberdade; de novembro a janeiro formaram-se os casais para a nova época reprodutiva, com registo das interações entre os membros de cada casal, deteção de comportamentos de cio e registo das cópulas entre o casal; de fevereiro a abril foi essencial acompanhar as várias fêmeas gestantes no que se refere ao comportamento pré-parto, ao próprio parto, aos cuidados maternos e ao desenvolvimento das crias nos primeiros dias de vida. Estes foram momentos marcantes e críticos a nível médico-veterinário, acompanhados por toda a equipa, de forma a assegurar a saúde da fêmea e da ninhada. Continuando até julho, o desenvolvimento das crias foi seguido com cautela, procurando assegurar a sua sobrevivência e identificar possíveis

situações de risco, como por exemplo, lutas entre crias e gestão das mesmas por parte da progenitora, deteção e acompanhamento de indivíduos que possam manifestar epilepsia juvenil, para uma pronta intervenção em caso de convulsão. Em 2017 acompanhou-se o crescimento de treze crias até jovens adultos, fruto dos casais “Jabaluna” e “Jerte”, “Flora” e “Madagáscar”, “Fresa” e “Hermes”, “Biznaga” e Drago”, “Era” e “Fado”; em 2018, assistiu-se ao nascimento de oito crias, dos progenitores “Flora” e “Madagáscar”, “Juncia” e “Fado”, “Kaida” e Fresco”.

Paralelamente, foi necessário acompanhar, não só as ninhadas como todos os restantes adultos e transformar a informação recolhida em dados objetivos, através de ferramentas como o *scan* ou varrimento, uma ferramenta útil na monitorização dos animais.

Videovigilantes, tratadores e médicos veterinários dedicados trabalharam em estreita cooperação, quer seja para efetuar o manejo diário dos vários animais, quer para atuar prontamente numa situação de urgência, e.g. na intervenção em múltiplas ocorrências de ataque epilético de uma cria de 2017, “Olívia”, e na monitorização de animais com insuficiência renal crónica, nomeadamente no agravamento do quadro clínico de uma fêmea reprodutora, “Fresa”.

Medicina Veterinária

Durante o período de estágio, houve a oportunidade de assistir à captura e vacinação de quatro fêmeas adultas (“Biznaga”, “Artemisa”, “Era” e “Juncia”); participar num exame geral de um macho jovem (“Nabão”); quatro exames reprodutivos de duas fêmeas (“Fruta” e “Juromenha”) e dois machos (“Drago” e “Gamma”); vinte e um exames gerais de crias e um caso de Cria Artificial.

Vacinação

A vacinação dos animais adultos, independente do exame geral, é um ato médico realizado junto aos cercados, com o animal dentro da jaula de captura. Este é um procedimento rápido e o animal é de imediato libertado no seu cercado.

Exame Geral e Reprodutivo de Adultos

Para realização de exame geral e/ou reprodutivo, após a captura, os animais foram transportado para a clínica veterinária do CNRLI. A indução anestésica foi feita ainda na jaula, com administração intramuscular (IM) de *Dexmedetomidina*, *Quetamina* e *Midazolam*. Quando necessário, foi feita a manutenção com anestésico volátil *Isoflurano*.

Durante estes procedimentos, realizei funções de monitorização da anestesia, registo dos parâmetros vitais e acompanhamento do animal no recobro, até ser libertado no cercado.

Do exame geral, fez parte o exame físico completo, realização de morfometrias e recolha de amostras biológicas (e.g. zaragatoas oral e retal, sangue, pelo). Em alguns casos, foram realizados exames complementares de diagnóstico, nomeadamente radiografia e exame ecográfico.

Electroejaculação e Inseminação Artificial

A época reprodutiva de 2018, contou com técnicas de reprodução assistida. Participei, com funções de monitorização anestésica e pós anestésica, na primeira tentativa de sincronizar o estro nesta espécie nas fêmeas “Juromenha” e “Fruta”, inseminação artificial da fêmea “Fruta” nos cornos uterinos, por laparoscopia, com sémen fresco retirado do macho “Drago”, por electroejaculação, e exame reprodutivo e electroejaculação do macho “Gamma”, de 8 anos, no Jardim Zoológico de Lisboa.

Exames de estado geral das crias

Os primeiros exames de crias realizaram-se aos 30, 60 e 90 dias de vida. Aos 30 dias, realizou-se o exame físico geral, com especial atenção para a condição corporal, desparasitação, recolha de zaragatoas de orofaringe e reto, pelo e sangue para confirmação de ausência de doenças infecciosas antes da vacinação. Aos 60 dias repetiu-se o exame físico, desparasitação interna, procedeu-se à colocação de *microchip* e administração da primeira dose vacinal, *Fevaxyn Pentofel (Zoetis®)* e *Purevax FeLV (Merial®)*. A revacinação é feita aos 90 dias. Caso se justifique, são realizados exames complementares de diagnóstico e, em última instância, a cria é colocada em situação de Cria Artificial.

Em outubro, foi realizado um quarto exame geral a alguns elementos de cada ninhada, com captura, transporte para a clínica e anestesia, seguindo o protocolo dos animais adultos, de modo a ser possível a colocação de coleiras de identificação dos indivíduos de cada ninhada. Em janeiro ocorreu o último exame pré-solta, a todos as crias que seriam libertadas em 2018. Neste procedimento estiveram também presentes elementos da equipa de campo do local onde cada cria iria ser reintroduzida, quer seja em Portugal ou Espanha, responsáveis pela colocação de coleiras transmissoras equipadas com sistemas GPS/GSM (*Global Positioning System/ Global System for Mobile Communications*) e VHF (*Very High Frequency*). Foi feito um exame físico completo, morfometrias, aplicação de desparasitante externo e revacinação.

Cria Artificial

A decisão de intervir numa ninhada e retirar uma cria para situação de cria artificial deve ser uma decisão bem ponderada, tendo em conta o futuro do animal no programa, uma vez que um animal criado em contacto com humanos não pode ser reintroduzido em meio natural, e a sobrevivência de toda a ninhada, pesando as consequências que uma

intervenção humana pode ter na reação da progenitora. Das crias nascidas em 2018, duas, de diferentes progenitoras, foram colocadas em situação de Cria Artificial, por apresentarem sinais de reduzida vitalidade e subnutrição. Lamentavelmente, ambas acabaram por não resistir, apesar da terapêutica instituída. Foi possível acompanhar e participar no caso clínico da primeira cria a ser intervencionada, “P1 Flora”, filha de “Flora” e “Madagáscar”.

Saídas de Campo

As crias aptas a ser reintroduzidas, de acordo com parâmetros comportamentais, genéticos e de saúde, podem ser libertadas. Durante o período de estágio, foram libertadas onze crias em Portugal, tendo havido oportunidade de participar na captura, transporte e libertação de três, uma no concelho de Mértola, “Óregão” (Figura 1), filho de “Flora”, e duas no concelho de Serpa, “Ouriço”, filho de “Fresa” e “Odelouca”, filha de “Era”.

O seguimento dos lince reintroduzidos é feito pela equipa de campo, que localiza os animais através do sinal de rádio VHF e GPS/GSM emitido pelas coleiras e, sempre que possível, através da observação direta dos mesmos. Existem ainda vários pontos estratégicos com sistema de vídeo-armadilhagem para monitorização dos animais. Foi possível acompanhar estas atividades em saídas com a equipa de campo de Mértola e Serpa, nas quais foram também realizadas as colheitas de amostras de água para posterior análise neste estudo.

Figura 1: Libertação em Mértola de um lince nascido no CNRLI (original).



1. Introdução

Até meados do século XIX, o lince ibérico (*Lynx pardinus*), esteve presente por toda a Península Ibérica (Rodríguez & Delibes, 1992) mas, a sua população foi progressivamente desaparecendo nos últimos dois séculos, tornando-o no felino mais ameaçado do mundo (López *et al.*, 2009).

Confrontados com a ameaça da extinção, Portugal e Espanha uniram esforços para a implementação de medidas de conservação da espécie, trazendo uma nova esperança para este felino. Com efeito, após se encontrar extinto em território nacional, o lince ibérico voltou a caminhar em território português em 2015 (Sarmiento, Carrapato, Eira & Silva, 2017).

Apesar dos programas de vigilância ambiental e proteção de habitats, a intoxicação acidental ou intencional da fauna silvestre ainda ocorre, maioritariamente devido à exposição a pesticidas. No entanto, outras substâncias podem ser uma ameaça à saúde e sobrevivência de determinadas espécies, como por exemplo, os metais pesados. As manifestações de intoxicação por metais, são mediatas e derivadas, na maioria das vezes, de exposições reiteradas a quantidades ínfimas, concorrendo também fenómenos de bioacumulação e/ou biomagnificação (United States Environmental Protection Agency [USEPA], 2007). Estes fenómenos, aliados ao facto dos metais não serem biodegradáveis, é motivo de grande preocupação (Hunter, 1989), tendo em conta as possíveis consequências diretas e indiretas para os seres vivos, relacionadas com fenómenos de cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, carcinogenicidade, reprotoxicidade e ainda doenças respiratórias e imunossupressão (Wren, 1986; Goyer, 1996, citado por Millán *et al.*, 2008).

Na ausência de estudos que diretamente tenham o foco nesta espécie ou no território que ocupam, pretende-se com este projeto recolher dados relativos à presença de metais na água nos pontos de abeberamento, na área de reintrodução do lince ibérico, e, caso estejam presentes, se a sua quantidade representa uma ameaça, não apenas para esta espécie, mas para o ecossistema, tendo em conta a relação próxima entre o ambiente, a fauna e a saúde pública.

Para atingir os objetivos foi necessário a contribuição de diversas entidades, às quais desde já se agradece, nomeadamente:

- Departamento de Conservação da Natureza e Florestas do Alentejo do Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF), ao qual este projeto foi apresentado, para que, se aprovado, fossem concedidas as respetivas autorizações de colheita, bem como recursos materiais e humanos;

- Responsáveis das Zonas de Caça e proprietários, para autorização de acesso e de colheita de amostras sempre que os pontos de colheita selecionados se situassem em terrenos privados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)

O lince ibérico pertence à família Felidae, subfamília Pantherinae e ao género Lynx (Rodríguez & Calzada, 2015). As quatro espécies do género Lynx existentes atualmente, lince vermelho (*L. rufus*), o lince-do-canadá (*L. canadensis*), o lince euroasiático (*L. lynx*) e o lince ibérico (*L. pardinus*), são descendentes de um ancestral comum (*Lynx issiodorensis*, Johnson *et al.*, 2004) que divergiu de outra espécie de felino há mais de 6 milhões de anos (Johnson & O'Brien, 1997). Estas quatro espécies têm distribuições e habitats distintos, embora o *L. lynx* e o *L. pardinus* habitem no continente europeu (Nowell & Jackson, 1996).

O lince ibérico tem menores dimensões do que o lince euroasiático, possuindo um peso médio de 12.8 quilogramas (kg) num macho adulto e 9.3 kg numa fêmea (Beltran & Delibes 1993, citado por Nowell & Jackson, 1996). Possui uma pelagem parda com um padrão “pintado” distinto para cada indivíduo, barbas compridas, pincéis escuros na ponta das orelhas e cauda curta com uma mancha escura na extremidade (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade [ICNB], 2005b; Santos, 2016), e está perfeitamente adaptado ao habitat onde se encontra (Figura 2).

Figura 2: Lince ibérico em liberdade em Portugal (2018) (fotografia por Carlos Carrapato).



O lince ibérico é um predador altamente especializado e a sua presa maioritária é o coelho-bravo-europeu, *Oryctolagus cuniculus*. Um lince adulto deve comer um coelho por dia para satisfazer as suas necessidades nutricionais (Ferrerias, Rodríguez, Palomares & Delibes, 2010). Em épocas e regiões com menor abundância de coelho, esta presa pode ser substituída por roedores, cervídeos, anatídeos e lebre (Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas [ICNF], 2018a).

O lince procura tipicamente bosques, matagais e matos densos para abrigo e reprodução, alternando com biótopos abertos para captura de presas (Palomares, Rodríguez, Laffitte & Delibes, 1991), evitando ambientes mais humanizados como plantações florestais e campos agrícolas, embora possa utilizar estas zonas na fase de dispersão (Palomares *et al.* 2001). A dimensão da área vital dos lincos varia com a abundância do coelho, ocupando territórios de menores dimensões quando a densidade da presa é maior (Ferrerias, Beltrán, Aldama & Delibes, 1997).

As características reprodutivas destes felinos revelam também algumas particularidades. Segundo estudos efetuados em Andaluzia, Espanha, na população do Parque Nacional de Doñana, (Johnson *et al.*, 2004), a época de cio ocorre de janeiro a julho, predominantemente em janeiro-fevereiro, seguida de 64-65 dias de gestação, em média. A época de partos concentra-se nos meses de março e abril, originando ninhadas de 2 a 4 crias. Estas tornam-se independentes quando adquirem as características predatórias necessárias para providenciar o seu próprio alimento, o que acontece entre os 7 e os 10 meses. Embora seja referido, que entre os 8 e os 23 meses, é habitual que os jovens dispersem (Nowell & Jackson, 1996), em Portugal há registos de crias com idade superior a um ano a interagir positivamente com ambos os progenitores, inclusive o caso de fêmeas a acompanhar a mãe e os irmãos de uma nova ninhada, no ano reprodutor seguinte.

2.1.1. Da Extinção à Reintrodução

No final do século XIX o lince ibérico tornou-se a primeira espécie de felino a ser listada como “criticamente ameaçada” pela IUCN/SSC (Rodríguez & Calzada, 2015).

A regressão das populações de coelho bravo devido à propagação de duas epizootias de origem vírica – mixomatose e doença hemorrágica viral - constituiu uma das principais causas da redução dramática da população deste felino, aliada à destruição de habitat e morte por ação humana dolosa (Guzmán *et al.*, 2005 citado em Sarmiento *et al.*, 2009).

Na década de oitenta, a espécie apresentava uma distribuição localizada na zona central e sudoeste da Península Ibérica, com uma área de distribuição estimada em 11 000 km² (Rodríguez & Delibes, 1992), até finalmente ficar reduzida a duas populações reprodutoras: Doñana-Aljarafe e Andújar-Cardena (Simón, Gil-Sánchez & Ruiz, 2012), com menos de 170 indivíduos (Simón *et al.*, 2009), assinaladas a amarelo no mapa da Figura 3.

Em Portugal, historicamente ocorreu uma distribuição muito restrita e altamente fragmentada em cinco áreas principais de ocorrência: Malcata, S. Mamede, Vale do Guadiana, Vale do Sado e Algarve-Odemira. No entanto, o último vestígio da presença do lince em Portugal é um excremento encontrado na Serra da Adiça, em 2001 (ICNB, 2008b) e nos trabalhos de campo realizados a nível nacional entre 2002 e 2003 já não foi possível detetar a presença da espécie (Sarmiento *et al.* 2004).

Figura 3: Distribuição das populações de lince ibérico em 2004 na Península Ibérica (Guzmán *et al.* 2005, citado em Iberlince, 2018).



2.1.2. Medidas de Conservação *Ex-situ*

Face ao desaparecimento da espécie em território português e à precariedade da sua população em Espanha, foram criadas medidas de conservação ao abrigo do Projeto Life+Iberlince, entre as quais o início, em 2003, de um programa de reprodução em cativeiro, para produzir indivíduos aptos a nível físico e comportamental para reintrodução (Lynxexsitu, 2018b). Existem atualmente cinco centros de reprodução em cativeiro: El Acebuche, Zoobotânico de Jerez, La Olivilla e Zarza de Granadilla, em Espanha, e o Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico, em Portugal. Este último foi inaugurado em 2009 no concelho de Silves, incluído na área de ocorrência histórica do lince (Lynxexsitu, 2018a).

A reprodução em cativeiro não é suficiente para a sobrevivência da espécie, sendo fulcral que esteja aliada a uma eficaz gestão genética e demográfica das populações. Para minimizar as perdas de diversidade genética na população em cativeiro foi criado, em 2005, o Banco de Recursos Biológicos (Crespo *et al.*, 2007) e os indivíduos fundadores foram selecionados e genotipados de modo a calcular os índices de parentesco entre todos os pares, para que estivesse representada a máxima proporção de diversidade natural (Lynxexsitu, 2018b).

Esta medida adquire extraordinária importância devido aos baixos níveis de DNA mitocondrial e de microssatélites nucleares do lince ibérico, em comparação com outros felinos. Esta perda de diversidade genética pode ter resultado de um fenómeno de afunilamento demográfico durante pelo menos uma era glacial, na qual a espécie esteve restrita na península ibérica, tal como aconteceu a outras espécies, agora endémicas destes dois países. Adicionalmente, o reduzido número do efetivo populacional, combinado com o isolamento das populações que restaram na década de 80, contribuíram para o aumento da consanguinidade e perda de diversidade genética (Johnson *et al.*, 2004). Foi observado em

populações com reduzido número de indivíduos, persistente ao longo de gerações, especialmente na região de Doñana, sinais de deterioração genética e demográfica, incluindo o aparecimento tendencial de indivíduos de determinado sexo, redução do número de crias por ninhada e aumento da mortalidade devido a doenças e outras causas naturais (Palomares *et al.* 2012). A mortalidade por causas naturais pode ter um impacto superior em populações pequenas, atendendo a que elevados níveis de consanguinidade favorecem o aparecimento de determinadas doenças ou aumentam a vulnerabilidade a determinados componentes ambientais (López *et al.*, 2014). Doenças como tuberculose bovina, peritonite infecciosa felina, leucemia felina e imunodeficiência felina são doenças que, embora não sejam ainda consideradas preocupantes nas populações selvagens, poderão vir a revelar-se como mais um potencial fator de ameaça (ICNB, 2005b).

2.1.3. Medidas de Conservação *In-situ*

Considerando que a reprodução de lince em cativeiro não é, por si só, a solução para a subsistência da espécie, foram estabelecidas seis áreas de reintrodução em 2012, com capacidade para sustentar as futuras populações, uma vez que a conservação do lince ibérico depende sobretudo da gestão e recuperação do seu habitat, fomento das populações de presas e redução das causas de mortalidade. Para que estas condições sejam asseguradas, foi criada a Rede Natura 2000, uma rede de áreas de proteção especial, cada uma com uma legislação própria, adequada às características locais e exigências do ecossistema a proteger (ICNB, 2005b).

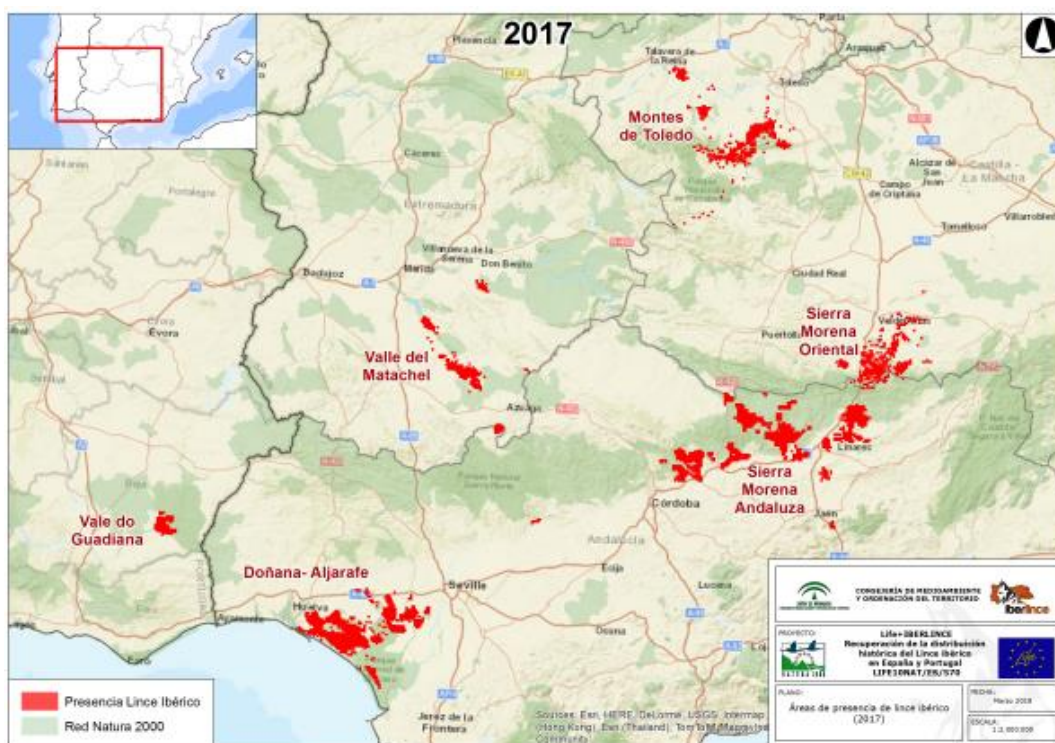
Em Portugal a área foi escolhida de acordo com as características do habitat, das ocorrências de armadilhas ilegais, do risco de atropelamento e da dimensão e densidade da população de coelho bravo (ICNB, 2005b). Relativamente ao coelho bravo, que deve ter uma densidade populacional mínima de 4,6 coelhos por hectare durante a época de reprodução (Palomares *et al.*, 2001), foram tomadas medidas para proteção e crescimento das populações, como o fornecimento de água, comida, pontos de abrigo e a monitorização do seu estado sanitário. Para além destes fatores, outro de extrema importância é a aceitação social do lince ibérico, sendo fundamental a sensibilização e apoio da população local, proprietários de terrenos e caçadores (ICNB, 2005b).

Em 2015, foram libertados os primeiros 10 lince em Portugal, que iriam dar início à nova população, no concelho de Mértola (Sarmiento *et al.*, 2017). Entre 2015 e 2017 foram libertados mais 33 animais, a que se somaram dois lince provenientes de Espanha, que fixaram território em Portugal. Atualmente, além de Mértola, os lince ocupam territórios em Serpa e Castro Verde, podendo ainda dispersar para Almodôvar e Alcoutim. No geral, em 2017, a população de lince ibérico havia subido para os 589 indivíduos distribuídos por Andaluzia, Extremadura Espanhola, Castela-Mancha e Alentejo (Figura 4) (Mata, 2017).

Em 2018, foram confirmados 57 animais adultos a viver no Alentejo, assim como o nascimento de mais de 20 crias em liberdade nesse ano e, em 2019, o total de lince em Portugal e Espanha, aproxima-se dos 650 indivíduos. Estes dados são recolhidos devido ao acompanhamento efetuado na população atual através do seguimento por rádio, foto-armadilhagem e análises genéticas, essencial para o sucesso da reintrodução.

Devido ao crescimento das populações e à expansão do território ocupado, a classificação desta espécie alterou-se para “Ameaçada” (Rodríguez & Calzada, 2015).

Figura 4: Distribuição das populações de lince ibérico em 2017 (Mata, 2017).



2.1.4. Ameaças

Apesar do aumento da população de lince ibérico nos últimos anos, a situação é ainda preocupante e as ameaças à sobrevivência da espécie mantêm-se, nomeadamente, a reduzida abundância de coelho na península ibérica, ocupação humana dos seus habitats, a baixa diversidade genética (López *et al.*, 2014), a morte de lince por ação criminosa, assim como um elevado número de mortes por atropelamento (Simón *et al.*, 2012). De facto, esta espécie é particularmente afetada pelos atropelamentos, apresentando um tipo de comportamento que o torna bastante vulnerável, particularmente durante o período de dispersão juvenil ou quando se trata de animais divagantes, com grandes movimentações (ICNB, 2005b).

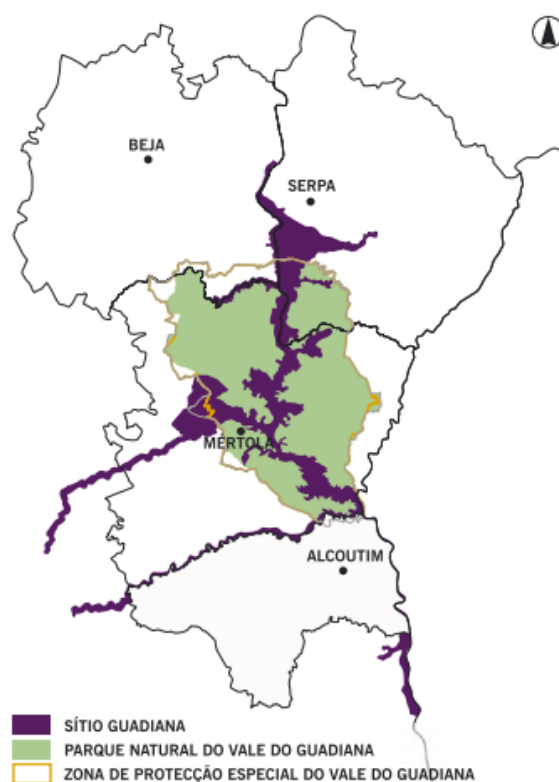
2.2. Área de Reintrodução em Portugal

Em Portugal, a primeira área seleccionada, inclui o Parque Natural do Vale do Guadiana, classificada como *Sítio de Importância Comunitária* da Rede Natura 2000 e territórios envolventes, num total de 85 000 hectares (Sarmiento *et al.*, 2017).

Sobre o território recaem os seguintes estatutos (Figura 5): Parque Natural segundo o Decreto Regulamentar nº 28/95 de 18 de novembro; Área Protegida segundo o Decreto-Lei n.º 19/93 de 23 de janeiro que estabelece a Rede Nacional de Áreas Protegidas (AP's); Sítio do Guadiana e Zona de Protecção Especial (ZPE) de acordo com o Decreto-Lei n.º 384-B/99 de 23 de Setembro.

O Parque Natural do Vale do Guadiana ocupa 69 773 hectares, estende-se por parte dos concelhos de Mértola e Serpa e inclui um troço do Rio Guadiana, desde uma zona a montante do Pulo do Lobo até à foz da ribeira de Vascão, fronteira entre o Alentejo e o Algarve (ICNF, 2018b). A área é caracterizada por três unidades paisagísticas principais: a peneplanície alentejana com culturas extensivas de sequeiro, terrenos em pousio, pastagens, áreas de esteval e montado de azinho; as elevações quartzíticas das serras da Alcaria Ruiva, de S. Barão e de Alvares e os vales do Rio Guadiana e seus afluentes, com margens escarpadas e revestidas por matagal mediterrânico (Cardoso *et al.*, 2008).

Figura 5: Estatuto de protecção da área de intervenção do Plano de Gestão do Vale do Guadiana (Cardoso *et al.*, 2008).



2.2.1. Fauna

A grande variedade de habitats desta área permite a existência de um complexo ecossistema com fauna muito variada.

Nos cursos de água, a fauna piscícola conta com 16 espécies de peixes autóctones e migradores, dos quais 10 são endemismos ibéricos, estando, em Portugal, 4 restringidos apenas à bacia hidrográfica do Guadiana. Existe também uma grande diversidade de bivalves com quatro espécies nativas, todas ameaçadas, principalmente devido à perda e/ou fragmentação de habitat, assim como, pelo menos 13 espécies de anfíbios.

Podem ainda ser encontradas 20 espécies de répteis, algumas de grande importância e raridade e há conhecimento da existência de 35 espécies de mamíferos. Entre estes, destacam-se várias espécies de morcegos, a lontra (*Lutra lutra*), o gato bravo (*Felis silvestris*), o leirão ou rato-dos-pomares (*Elyomys quercinus*), a gineta (*Genetta genetta*) e atualmente, o lince ibérico (*Lynx pardinus*) (ICNF, 2018c).

É uma zona rica em coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*), podendo ser também avistada facilmente a lebre (*Lepus capensis*) e, em algumas zonas, o veado (*Cervus elaphus*) e o gamo (*Dama dama*), devido ao recente repovoamento, feito por particulares (Lecoq, 2002).

A avifauna constitui um dos grupos mais significativos do Parque com cerca de 161 espécies identificadas, das quais 43 estão incluídas no Anexo I da Diretiva Aves (Espécies de aves de interesse comunitário cuja conservação requer a designação de ZPE's), e seis são consideradas prioritárias para a conservação, nomeadamente a águia de Bonelli (*Aquila fasciata*), o abutre-preto (*Aegypius monachus*), a abetarda (*Otis tarda*), o sisão (*Tetrax tetrax*), o Peneireiro-das-torres (*Falco naumanni*) e a águia-imperial-ibérica (*Aquila adalberti*) (Cardoso *et al.*, 2008). Esta última, é uma das aves de rapina mais ameaçadas da Europa, também exclusiva da Península Ibérica, com estatuto de conservação de “ criticamente em Perigo ” em território nacional (ICNB, 2005a). A sua principal presa é o coelho-bravo, pelo não é incomum partilhar áreas de ocorrência com o lince ibérico (LifeImperial, 2018).

2.2.2. Rede Hidrográfica

O Parque Natural está inserido na bacia hidrográfica do rio Guadiana que se estende por cerca de 66 889 km², dos quais 83% pertencem ao território espanhol (Cardoso *et al.*, 2008; ICNF, 2018d).

O rio Guadiana, nasce nas Lagoas de Ruidera a 1700 metros de altitude, em Espanha (Feio, 1946, citado por Lecoq, 2002) e entra em Portugal, no Caia, Elvas, após um percurso de 280 km. É a fronteira natural entre os dois países ao longo de algumas dezenas de quilómetros até mais a Sul, já no concelho de Mourão, o seu percurso continuar na totalidade em território nacional, ao longo de 140 km. Depois, torna a ser fronteira desde o Pomarão até Vila Real de Santo António, percorrendo um total de 810 km, da nascente até à

foz (Lecoq, 2002). Como afluentes na margem direita, existem as ribeiras de Terges e Cobres, Oeiras, Carreiras, Vascão e, na margem esquerda, a ribeira de Limas (Cardoso *et al.*, 2008; ICNF, 2018d) e a do Chança. Embora com menor expressão, existem ainda as ribeiras da Esteveira, da Lampreia, de Alvacar, de Alvacarejo, da Fontinha, do Mosteirão, do Vale de Açor, do Freixial, do Vale Covo e da Corte Pequena Fonte (Lecoq, 2002).

2.2.3. Clima

O clima deste território é tipicamente mediterrâneo, com um grande contraste entre as altas temperaturas no Verão e o frio do Inverno. De um modo geral, é uma zona seca, onde se verificam as precipitações mais baixas do país, concentradas sobretudo, entre os meses de outubro a março, com valores quase nulos no Verão, o que tem como consequência uma grande variação no caudal dos cursos de água existentes (Cardoso *et al.*, 2008).

2.2.4. Solos

A área do Parque insere-se na Zona Sul Portuguesa, uma das unidades do Maciço Hespérico (Maciço Antigo) e faz parte da Faixa Piritosa Ibérica (FPI). Trata-se de uma zona de declives médios e acentuados com elevado risco de erosão e solos bastante rochosos, constituídos principalmente por rochas metamórficas (Cardoso *et al.*, 2008; ICNF, 2018d), pobres em matéria orgânica, baixa capacidade de retenção e armazenamento de água, o que os torna pouco aptos para agricultura, obrigando ao recurso a significativas quantidades de fertilizantes químicos (Lecoq, 2002).

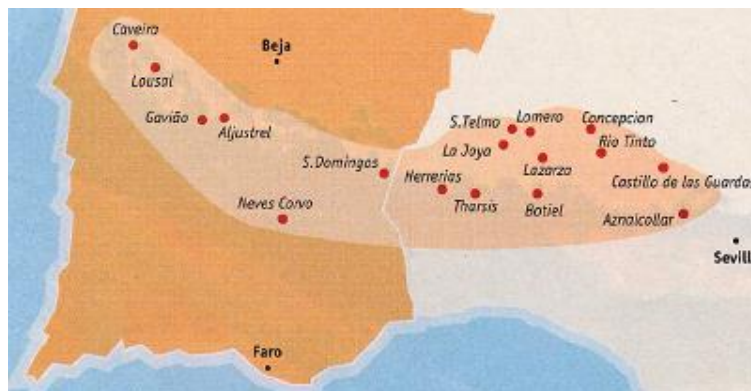
2.3. Faixa Piritosa Ibérica

A FPI estende-se ao longo de 300 km, de Grândola até Sevilha (Silva, 1998 citado em Laneiro, 2012) e teve uma elevada importância económica para Portugal durante a segunda metade do século XIX e primeira metade do século XX, levando à instalação de vários complexos mineiros (Figura 6) (Laneiro, 2012). Este território possui jazigos de grande tonelagem, com elevados teores em metais de interesse económico. Estas características garantiram a viabilidade económica das minas da FPI para a extração de cobre, zinco, chumbo (Rosado *et al.*, 2008), ferro, manganês (Laneiro, 2012) e, em alguns casos, de metais preciosos como a prata (Matoso, 1998) e o ouro (Rosado *et al.*, 2008).

Em Portugal, existe um grande número de minas abandonadas, com diferentes tipologias e a quase totalidade não possui estruturas adequadas que minimizem o impacto ambiental. A elevada instabilidade verificada em escombros de minas como a de São Domingos, Lousal, Caveira, Montinho, Ferragudo, Balança e Barrigão, favorece a disseminação dos elementos contaminantes, o desgaste rápido e rutura dos corpos de escombros mais

volumosos, com o conseqüente transporte de finos para a água, o principal veículo de disseminação dos poluentes (Matos e Martins, 2006, citado em Laneiro, 2012).

Figura 6: Ilustração da Faixa Piritosa Ibérica com representação dos principais focos de atividade mineira (adaptado de Lecoq, 2002).



As principais conseqüências ambientais derivadas da atividade mineira, são causadas pela ocorrência de drenagem ácida. Os troços da rede hidrográfica situados a jusante dos centros mineiros da FPI encontram-se afetados em vários quilómetros com águas de pH ácido (<4), o que provoca graves problemas ecológicos que podem persistir bastante tempo após o abandono das atividades mineiras, dificultando o desenvolvimento de uma cobertura vegetal espontânea nas áreas envolventes e sobre as escombrelas e a degradação de ecossistemas ribeirinhos próximos (Matoso, 1998).

A Ribeira de São Domingos, afluente da ribeira do Chança, constitui um exemplo de curso de água afetado pela drenagem não controlada de efluentes ácidos provenientes da área mineira de São Domingos (Moreira *et al.*, 2011). O depósito da Mina de São Domingos localiza-se a cerca de 16 km da sede do concelho de Mértola, composto por 1,25% de cobre, 1% de chumbo, 2% de zinco e 45-48% de enxofre (Álvarez-Valero *et al.*, 2008). Deixou de laborar em 1967, mas, apesar do seu encerramento, continua a ter grande impacto ambiental, tanto no interior da unidade como numa área mais vasta (Laneiro, 2012), tendo sido detetados teores preocupantes de arsénio (As), chumbo, cobre, zinco e ferro na proximidade da mina (Rosado *et al.*, 2008).

Das explorações mineiras em laboração na FPI, destaca-se a mina de Neves-Corvo, dedicando-se à extração de cobre, estanho e, mais recentemente, zinco. Apesar de ser um projeto mineiro apontado como exemplo na atividade extrativa, no que respeita a normas ambientais, um dos principais problemas relacionados com o impacto dos resíduos do tratamento do cobre surge durante o processo de extração. Muitas vezes associados à exploração mineira e à indústria transformadora surgem fenómenos de poluição da atmosfera e dos recursos hídricos por metais pesados (Moreira *et al.*, 2011).

2.4. Metais Pesados

“Metais pesados” é um termo geral coletivo que se aplica ao grupo de metais e metaloides com densidade atômica superior a 5 g/cm³ (Hawkes, 1997; Zovko & Romic, 2011), sendo também definido como um grupo de elementos metálicos com elevada densidade comparada com a água, presentes em várias matrizes em quantidades vestigiais mas ainda assim com capacidade de induzir efeitos deletérios (Bhargava, Carmona, Bhargava & Srivastava, 2012; Hejna *et al.*, 2017). Devido às quantidades presentes serem vestigiais, muitas vezes é utilizado o termo “elemento traço” que se refere aos elementos que se encontram na composição de solos e plantas, em quantidade inferior a 0,1% (Zovko & Romic, 2011).

Os metais pesados, chumbo, cádmio, zinco, mercúrio, arsênio, prata, crômio, cobre, ferro e o grupo de elementos de platina (Nriagu & Pacyna 1988; Nriagu, 1989; Garbarino *et al.*, 1995 citado em Duruibe, 2007) ocupam a base da tabela periódica e são caracterizados por diversas propriedades, entre as quais a elevada densidade, reflexibilidade, condutividade elétrica e térmica, ductilidade e força (Tokar, Boyd, Freedman & Waalkes, 2015).

Alguns elementos são essenciais à saúde devido à sua participação em funções fisiológicas (Underwood and Suttle, 2001). Como tal, é aconselhado que elementos como cobalto, cobre, crômio, ferro, manganês, molibdênio, selênio (Se) e zinco façam parte de uma dieta equilibrada, sendo denominados de microelementos. No entanto, sob condições específicas, podem causar impactos negativos nos diferentes ecossistemas, podendo causar intoxicações agudas ou crônicas (Hejna *et al.*, 2017).

Por outro lado, outros metais como As, Cd, Pb, e formas metiladas de Hg não são necessários para qualquer fim biológico e a exposição, ainda que em quantidades reduzidas pode induzir efeitos deletérios (McCluggage, 1991).

A toxicidade dos metais, essenciais ou não, depende de uma diversidade de fatores que, tal como noutros químicos, podem estar dependentes da exposição (e.g. dose, via, duração e frequência), do indivíduo (e.g. idade, género, genética, estado nutricional e capacidade de biotransformação) (Tokar *et al.*, 2015; Poppenga, 2011; Liu, Goyer & Waalkes, 2008), do próprio metal, nomeadamente da sua valência na natureza (Zovko & Romic, 2011).

A toxicidade pode manifestar-se devido a ação dos metais pesados sobre diversos processos: inibição de enzimas essenciais, como se verifica na síntese do grupo *heme*, por ação do Pb; por imitação e ligação de metais não essenciais, como o Cd e Cu, a locais reservados para microelementos; pela formação de compostos organometálicos que agem como substitutos de químicos biológicos, como o metilmercúrio (MeHg); por danos oxidativos mediados por metais, como o crômio e expressão anormal de genes, provocada pelo efeito carcinogénico, por exemplo, do Níquel (Ni) (Tokar *et al.*, 2015; Poppenga, 2011; Liu *et al.*, 2008).

Naturalmente, os organismos desenvolveram mecanismos de adaptação com o intuito de mitigar os efeitos tóxicos provocados pelos metais, por exemplo, pelo sequestro do metal em corpos de inclusão em vários órgãos, limitando os níveis do metal livre. No entanto, ao ter sido desenvolvida tolerância a células lesionadas que de outra forma teriam sido eliminadas, estes mecanismos podem contribuir para a toxicidade a longo prazo e eventual carcinogénese (Liu *et al.*, 2008).

2.4.1. Circulação dos Metais no Ambiente

Os metais são distribuídos naturalmente no ambiente, quer pelo ciclo biológico, quer geológico. A água da chuva dissolve minerais das rochas e transporta-os para rios e lençóis de água subterrânea, depositando e arrancando materiais do solo adjacente e, eventualmente, transportando estas substâncias (Tokar *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2008), quer dissolvidas, quer como parte integrante dos sedimentos (Ma & Rao, 1997), para oceanos onde precipitam como sedimento ou continuam o ciclo por passagem para a atmosfera sendo incorporadas novamente na água da chuva e posteriormente depositadas noutra local (Tokar *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2008). A circulação de metais pelo ciclo biológico envolve fenómenos de bioacumulação e biomagnificação nos seres vivos, aumentando a concentração do contaminante ao longo dos níveis tróficos da teia alimentar (Giulio & Newman, 2015).

Apesar dos metais pesados serem constituintes naturais da crosta terrestre, a contribuição antropológica para a sua quantidade no ar, na água, no solo e nos alimentos é reconhecida como a maior fonte de contaminação, por exemplo, através do uso de fertilizantes, herbicidas, inseticidas e fungicidas que utilizam metais na sua composição (Reis, Pardo, Camargos & Oba, 2010; Zovko & Romic, 2011; Bhargava *et al.*, 2012), nos lixos domésticos e industriais que contaminam fontes de água (subterrânea, lagos, ribeiros, rios), nas emissões de automóveis e nas minas (Ma & Rao, 1997) onde, em alguns casos, mesmo centenas de anos após o fim da atividade, a emissão de metais mantém-se (Duruibe *et al.*, 2007).

2.4.2. Toxicidade e ecotoxicologia dos metais

A ecotoxicologia é o estudo dos contaminantes na biosfera e os seus efeitos nos constituintes da mesma, dispondo, na maior parte das vezes, de dados muito limitados do que ocorre na natureza (Giulio & Newman, 2015). No entanto, a intoxicação de espécies selvagens por metais pesados é um problema reconhecido, derivado de exposição via inalação ou pela dieta, através de água ou alimentos (Rajeswari & Sailaja, 2014; Zovko & Romic, 2011).

A poluição química, geralmente não atinge níveis que provoquem mortalidade, embora esta possa ocorrer. As maiores preocupações ecotoxicológicas são a longo prazo. Os efeitos dos poluentes ou contaminantes ambientais num organismo, derivados de uma exposição crónica variam consoante a sua toxicodinamia, podendo afetar, entre outros, a reprodução, o desenvolvimento, o comportamento e a suscetibilidade a doenças numa população ou comunidade (Giulio & Newman, 2015).

O estudo efetuado em Doñana em 1982–83 (Hernández *et al.*, 1985), sobre metais pesados em mamíferos, incluindo cinco indivíduos de lince ibérico, relata que nenhum dos metais analisados atingia a concentração mínima tóxica. Contudo, níveis elevados de Hg foram encontrados no fígado de lontra-europeia (*Lutra lutra*).

Num outro trabalho efetuado por Ma e colaboradores (1991), foram estudadas duas espécies de pequenos mamíferos habitantes de áreas com solos contaminados por Cd e Pb: o musaranho-comum (*Sorex araneus*) da ordem *Insectivora* e o rato-do-campo-de-rabo-curto (*Microtus agrestis*) da ordem *Rodentia*, carnívoro e herbívoro, respetivamente. As concentrações de Cd e Pb encontradas nos órgãos alvo (rins e fígado) foram mais elevadas no *S. araneus* do que no *M. agrestis*. Os autores justificam esta diferença pela quantidade superior destes metais que é ingerida pelo musaranho-comum, devido à sua dieta insectívora.

Em 1998, a rede hidrográfica do rio Agrio-Guadiamar foi contaminada por efluentes ácidos arrastando Pb, Zn, Fe, As, Cu, Co, Cd, Ag, Hg e Se. Este derramamento tóxico inundou mais de 4000 hectares das terras adjacentes ao rio, tendo um impacto muito negativo no Parque Natural e Nacional de Doñana. Os efeitos deletérios foram estudados (Millán *et al.*, 2008) em várias espécies de vertebrados terrestres, como o rato-das-hortas (*Mus spretus*), a cegonha branca (*Ciconia ciconia*), o milhafre-preto (*Milvus migrans*) e o ganso-bravo (*Anser anser*). Contudo, não foram disponibilizados dados relativos a concentrações de metais em carnívoros que, estando nos níveis tróficos superiores, são mais afetados pelos processos de biomagnificação que possam ocorrer.

Também em vertebrados aquáticos se fazem sentir os efeitos deletérios dos metais. O cádmio e o cobre, têm sido relacionados com alterações comportamentais em peixes, por provocarem alterações nos neurónios olfativos (Giulio & Newman, 2015).

Está ainda documentado o efeito da exposição a metais pesados de ursos polares (*Ursus maritimus*) (Rush *et al.* 2008), do visão-americano (*Mustela vison*, Osowski *et al.*, 1995) e da pantera-da-Flórida (*Felis concolor coryi*, Newman *et al.*, 2004), sobre a qual Roelke *et al.* (1991) encontrou uma relação inversa entre a concentração de Hg no sangue de fêmeas lactantes e a sobrevivência das crias até aos 6 meses de idade.

Em suma, os efeitos potenciais dos poluentes e dos contaminantes ambientais químicos, na fauna silvestre, nomeadamente a imunossupressão e o aumento da vulnerabilidade a

doenças, são uma questão de importância relevante, podendo ser uma ameaça para inúmeras espécies (Giulio & Newman, 2015), como é o caso do lince ibérico.

Apesar do reconhecimento e até mesmo caracterização deste perigo, são escassos os estudos em espécies silvestres. As informações bibliográficas disponíveis sobre toxicidade dos metais referem-se maioritariamente a seres humanos, animais domésticos ou dados de ensaios toxicológicos.

2.4.3. Cádmio

O cádmio (Cd) é um elemento mineral altamente tóxico para animais e humanos, sem qualquer benefício biológico (Swarup *et al.*, 2007). A sua forma elementar, é rara na natureza, estando normalmente associada a atividades antropogénicas. Embora a frequência de utilização tenha vindo a diminuir devido à crescente preocupação ambiental, o Cd pode ser utilizado principalmente em ligas metálicas e soldas, como revestimento anticorrosivo, em tintas, como estabilizador de plásticos de polivinil (PVC) e em baterias (Ni-Cd) (Padeiro, 2014), fertilizantes fosfatados, pesticidas, plásticos, vidro e emissões automóveis (Roman *et al.*, 2002 citado em Reis *et al.*, 2010). Os fertilizantes fosfatados constituem a maior fonte de contaminação ambiental por cádmio, e ao infiltrarem-se no solo são arrastados até cursos de água superficiais e/ou subterrâneos (World Health Organization [WHO], 2011b). Na água para consumo humano, 0,005 mg/L é o valor de referência para o Cd (Decreto-Lei 152/2017, de 7 de Dezembro).

Em águas naturais, este elemento é maioritariamente encontrado ligado a sedimentos do fundo e a partículas em suspensão (Friberg *et al.*, 1986 citado por WHO, 2011b). O pH do meio pode influenciar a solubilidade do Cd, na medida em que águas ácidas facilitam a transformação de Cd ligado, a sedimentos ou em suspensão, para Cd dissolvido, tornando-se assim biodisponível e portanto de maior toxicidade para os seres vivos (Ros & Slooff, 1987 citado por WHO, 2011b). O Cd pode ser acumulado por plantas, algas e invertebrados, níveis tróficos inferiores, o que resulta na entrada deste elemento na teia alimentar, podendo afetar depois níveis tróficos superiores por biomagnificação (United Nations Environment Programme [UNEP], 2008).

Ensaio toxicológicos em ratos (Krajnc *et al.*, 1987 citado em WHO, 2011b), mostram que o envenenamento por cádmio causa descamação do epitélio e necrose da mucosa do trato gastrointestinal (TGI), alterações distróficas no fígado, coração e rins e, após administração repetida de doses reduzidas, foram também relatadas alterações nos ossos, fígado, sistema hematopoiético e sistema imunitário, assim como carcinogénese e teratogénese.

No Homem, em casos de exposição aguda por ingestão de Cd, também se verifica irritação do epitélio do TGI e sintomas como náusea, vômito e dor abdominal (Duruibe *et al.*, 2007). Os efeitos resultantes de exposição crónica são, no entanto, aqueles que causam

maior preocupação, face aos raros casos de exposição aguda. Para além de ser reconhecido como carcinogénico, a WHO (2011b), aponta a doença renal crónica como a consequência mais comum da exposição a Cd em doses baixas, caracterizada por proteinúria tubular (Duruibe *et al.*, 2007). Com a progressão da deterioração do rim, alterações no mecanismo de regulação do fósforo e do cálcio renal podem provocar reabsorção de minerais do tecido ósseo, aparecimento de urolitíase, osteomalacia (WHO, 2011b), osteoporose e fraturas espontâneas (Duruibe *et al.*, 2007).

2.4.4. Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento que ocorre naturalmente (WHO, 2005) em diversas formas e estados de oxidação: O Hg metálico, ou elementar, pode apresentar-se, à temperatura ambiente, como um líquido, ou como vapor, representando esta última forma maior perigo toxicológico. As formas oxidadas, Hg^{1+} e Hg^{2+} , podem estabelecer ligações com outros elementos, dando origem às formas inorgânicas, os sais de mercúrio (mercurosos ou mercúricos). Quando se liga a pelo menos um átomo de carbono, originam-se as formas orgânicas (metilmercúrio, etilmercúrio, etc) (Tokar *et al.*, 2015).

Entre as diferentes formas químicas de Hg, todas elas tóxicas, o metilmercúrio, CH_3Hg^+ (MeHg), resultante da metilação por microorganismos existentes nos sedimentos na água dos oceanos (Liu *et al.*, 2008), é a que apresenta maior periculosidade. A maior biodisponibilidade do MeHg, relativamente ao Hg inorgânico, aliada ao fenómeno de biomagnificação, resulta na presença de concentrações elevadas em predadores de topo (Hrudey, *et al.*, 1996 citado em Padeiro, 2014) em níveis 1800 a 80 000 vezes superiores aos níveis na água no meio envolvente (Tokar *et al.*, 2015).

O mercúrio teve diversas aplicações na agricultura e na indústria, por exemplo, no fabrico de produtos de odontologia, tintas, produtos farmacêuticos, processamento de madeira (com agente antifúngico) e ainda na indústria de papel e celulose (Adriano, 2001 citado por Padeiro, 2014). Apesar do uso industrial de Hg ter vindo a decair em vários países (WHO, 2005), é importante realçar que este sofre circulação global podendo atingir níveis elevados em pontos distantes dos locais de produção/descarga (Liu *et al.*, 2008).

Em Portugal, o valor referenciado para Hg na água para consumo humano é 0,001 mg/L (Decreto-Lei 152/2017, de 7 de Dezembro).

Os efeitos biológicos, variam de acordo com a forma de Hg. Compostos inorgânicos, quando ingeridos, são fracamente absorvidos pelo TGI e têm consequências principalmente a nível renal. O mesmo não se verifica no caso de MeHg, que tem grande biodisponibilidade, atuando como um potente neurotóxico, provocando alterações sensoriais, demência e falta de coordenação (Liu *et al.*, 2008).

Nas intoxicações crónicas, o principal efeito observado em ratos é nefrotoxicidade. Pode ainda estar associada à diminuição da fertilidade, malformações em fetos e aparecimento de tumores (WHO, 2005).

No Homem, a exposição a baixos níveis de mercúrio foi associada a sintomas neurológicos e fisiológicos inespecíficos (WHO, 2005) como depressão, anorexia, emaciação, alopecia, prurido, petéquias, diarreia crónica, fraqueza, andar rígido, que pode progredir para paresia, e ainda incoordenação e convulsões (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007). A exposição fetal foi relacionada com o aumento da probabilidade de aborto, malformações congénitas e atrasos no desenvolvimento de crianças (Rajeswari & Sailaja, 2014).

2.4.5. Chumbo

O chumbo (Pb) é o metal mais comum na crosta terrestre (WHO, 2011c), sendo a poluição de origem industrial um dos fatores importantes para a sua disponibilidade e acumulação no ambiente (Swarup *et al.*, 2007).

O Pb foi amplamente utilizado na indústria, mas o seu uso tem vindo a ser restringido em vários países: os compostos orgânicos foram utilizados como aditivos na gasolina (Liu *et al.*, 2008) em Portugal até 1999 (Decreto-Lei 186/99, 31 de Maio) e a sua forma metálica (Pb⁰) é resistente à corrosão e pode combinar-se com outros metais, formando diferentes ligas, tendo aplicação no revestimento de cabos, na produção de munições e na produção de tintas. O Pb foi também utilizado em canalizações, contribuindo para a presença de Pb na água de bebida (WHO, 2011c). Atualmente, o valor de referência de Pb na água para consumo humano em Portugal é 0,010 mg/L (Decreto-Lei 152/2017, de 7 de Dezembro).

O chumbo não tem qualquer função essencial nos processos celulares no organismo dos seres vivos (Tokar *et al.*, 2015). Pelo contrário, tem a capacidade de inibir esses mesmos processos fisiológicos essenciais em aves, seres humanos e outros mamíferos, causando alterações no desenvolvimento cognitivo e neurológico dos indivíduos expostos (Todorovic, Vujanovic, Dozic & Petkovic-Curcin, 2008). Ao interferir com o sistema nervoso, é particularmente perigoso para jovens, causando problemas de aprendizagem ou de comportamento. Os sintomas relatados incluem desorientação, dor de cabeça, irritabilidade e em casos graves, convulsões, coma e morte (Rajeswari & Sailaja, 2014).

Para além de neurotoxicidade, o Pb induz efeitos adversos no sistema cardiovascular, renal, gastrointestinal e reprodutivo (Duruibe *et al.*, 2007), estando também classificado como carcinogénico e teratogénico (Radostits *et al.*, 2007; Tokar *et al.*, 2015). Em doses elevadas, é depositado principalmente no fígado, córtex renal (Radostites *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2007), sistema endócrino (Swarup *et al.*, 2007) e sistema nervoso central (SNC), embora em menos quantidade (Radostits *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2007).

O chumbo substitui o cálcio em vários processos, interferindo com o mecanismo de regulação deste elemento (Markovac and Goldstein, 1988 citado em Rogers, 2010) e é, a longo prazo, incorporado nos ossos (Rajeswari & Sailaja, 2014; Tokar *et al.*, 2015; Swarup *et al.*, 2007).

Nos animais de produção, é em bovinos que se regista o maior número de casos de intoxicação por chumbo, seguido por ovinos e equinos (Reis *et al.*, 2010). No entanto, Waldner *et al.* (2002) refere que 4 a 12 % dos bovinos com concentrações sanguíneas consideradas tóxicas permanecem assintomáticos. Quando apresentam sintomas, estes podem ser descoordenação motora, *circling* (Swarup *et al.*, 2007), tremores musculares, ranger os dentes, obstipação, cegueira, convulsões ou morte súbita (Radostits *et al.*, 2007). Em ovinos, os sintomas relatados incluem fraqueza muscular, tremores, dor abdominal, convulsões (Radostits *et al.*, 2007), anestro e aborto (Swarup *et al.*, 2007). Equinos com intoxicações agudas apresentam anorexia, depressão, cólica, dispneia inspiratória, fraqueza muscular generalizada, convulsões ou morte súbita (Radostits *et al.*, 2007).

Em canídeos, doses elevadas de Pb provocam lesões no TGI, perda de peso, sinais neurológicos e eventualmente, morte (Hamir *et al.* 1981). À semelhança do observado em seres humanos, canídeos expostos a níveis reduzidos podem manifestar hipertensão associada com um ligeiro aumento da atividade do sistema renina-angiotensina (Fine, Vetrano, Skurnick & Ty, 1988) e lesões no SNC (Hamir, Sullivan & Handson, 1984). Rogers (2010) sugere que os mesmos efeitos se verifiquem em lobos (*Canis lupus*) e coiotes (*Canis latrans*).

Segundo Poppenga (2011) os felídeos domésticos também podem ser afetados, sendo os sinais clínicos mais comuns anorexia, vômito e convulsões, podendo também estarem presentes alterações no sistema vestibular, como nistagmos e ataxia. Uma vez que os solos podem estar contaminados com Pb, a exposição dos felídeos por via oral é provável, tendo em conta o seu comportamento de *grooming*.

A ecotoxicidade do Pb continua a ser uma preocupação. O impacto toxicológico deste metal é grande, principalmente sobre fauna que habite nas zonas próximas de minas ou indústrias que processam chumbo (Swarup *et al.*, 2007). Um grande número de indivíduos de diferentes espécies têm sido afetados quer através da cadeia alimentar, quer da ingestão direta de Pb que se encontre nos sedimentos.

A ingestão de artefactos ou resíduos provenientes de atividades lúdicas também é uma fonte de Pb a ter em atenção, nomeadamente acessórios de pesca no fundo de lagos (Liu *et al.*, 2008), em alguns casos com consequências fatais (Buekers *et al.*, 2009), e componentes de munições de armas de fogo em terrenos de caça. Esta última atividade tem grande impacto sobre a avifauna, principalmente em animais que se alimentam das vísceras deixadas no terreno que contenham fragmentos das munições (Giulio & Newman, 2015). De

forma semelhante, os mamíferos também podem ser expostos ao Pb pela ingestão destes fragmentos (Buekers *et al.*, 2009).

O estudo realizado por Rogers (2010) em gaivota-prateada (*Larus argentatus*), revelou que após exposição a níveis moderados de Pb, os animais demonstram perda de termorregulação e de capacidades motoras, com dificuldade em realizar tarefas básicas de aprendizagem e em reconhecer elementos familiares.

2.4.6. Arsénio

O arsénio (As) é um metaloide com várias formas e valências (Tokar *et al.*, 2008). Em comparação com as formas orgânicas, as inorgânicas são consideradas de maior periculosidade, sendo a forma trivalente (As^{3+}) 4 a 10 vezes mais tóxica do que a pentavalente (As^{5+}) (Poppenga, 2011) mas, no geral, para todas elas são conhecidos efeitos nocivos, quer para plantas quer para animais, incluindo os seres humanos (Padeiro, 2014).

Fontes antropogénicas de As incluem a fundição de metais não-ferrosos, a aplicação de pesticidas (Fernandes, 2012) e herbicidas, tendo sido utilizado também na constituição de revestimentos de madeira e agentes terapêuticos (Poppenga, 2011).

As principais vias de exposição dos animais a este elemento incluem a ingestão de água ou alimentos contaminados e, ainda que em menor extensão, a inalação de ar contaminado (Yan-Chu, 1994 citado por Padeiro, 2014).

Em diversas partes do globo, a água subterrânea (como fonte de água potável) está contaminada com elevadas concentrações de As (Fernandes, 2012). O valor de referência em Portugal, estabelecido para a água para consumo é de 0,010 mg/L (Decreto-Lei 152/2017, de 7 de Dezembro). Em águas de superfície bem oxigenadas, o As^{5+} é a forma mais frequente (Cui & Liu, 1988 citado por WHO, 2011a), enquanto que em águas subterrâneas, é mais comum a forma As^{3+} (Welch *et al.*, 1988, citado por WHO, 2011a). O estudo realizado em 2007 (Liu *et al.*, 2008) estima que mais de 137 milhões de pessoas em 70 países sofreram envenenamento por arsénio presente na água da bebida.

Liu *et al.* (2008), refere que a intoxicação aguda em seres humanos pode provocar febre, anorexia, hepatomegalia, insuficiência renal, melnose, arritmias, anemia hemolítica e paragem cardíaca. A nível neurológico a perda sensorial no sistema nervoso periférico é o sintoma mais comum, embora estejam relatados casos de encefalopatia, numa única dose de exposição, com dor de cabeça, letargia, desorientação, alucinações, convulsões e coma. A pele é o principal alvo em caso de exposição crónica, provocando alteração do epitélio, hiperpigmentação ou hipopigmentação, e hiperqueratose palmar-plantar. Pode também ocorrer doença hepática crónica, doença cardiovascular, neuropatia periférica e aparecimento de tumores.

Em espécies domésticas, a exposição ao As não está bem documentada mas casos de intoxicação aguda já foram relatados e felídeos domésticos são considerados como pertencentes a uma das espécies mais sensíveis. Os sintomas descritos incluem dermatite, dor abdominal intensa, salivação, vômito, diarreia (frequentemente hemorrágica), taquicardia, arritmias e morte. Experimentalmente, a exposição crónica em canídeos domésticos resultou em sinais pouco específicos, como anorexia e perda de peso (Poppenga, 2011).

2.4.7. Cobre

Cobre (Cu) é um nutriente essencial para plantas e animais, incluindo os seres humanos. É necessário em inúmeros processos biológicos e metabólicos, nomeadamente na função de várias enzimas (Georgopoulos *et al.*, 2001), sendo ainda responsável por influenciar a expressão de alguns genes (Padeiro, 2014). O cobre pode desempenhar o papel quer de micronutriente, quer de agente tóxico e é esse equilíbrio entre essencialidade e toxicidade, dependendo da concentração e especiação do mesmo, que reflete os efeitos biológicos provocados (Georgopoulos *et al.*, 2001).

O cobre metálico é maleável, dúctil e um bom condutor térmico (WHO, 2004). Esta versatilidade é a chave para a sua utilização na indústria, no fabrico de diversos materiais como fios elétricos, canalizações, ligas metálicas com zinco (latão) e bronze (estanho), revestimentos, munições, moedas, fungicidas, inseticidas e fertilizantes (ATSDR, 2004).

A contaminação dos cursos de água com efluentes domésticos é a maior causa antropogénica de contaminação ambiental (Georgopoulos *et al.*, 2001). O cobre pode ser encontrado em águas de superfície em complexos ou como matéria particulada (ATSDR, 2004). A sua toxicidade varia com a forma em que se encontra, sendo, por exemplo, os sais de cobre solúveis mais tóxicos do que compostos insolúveis (Linder & Hazegh-Azam, 1996)

Apesar de ser um elemento essencial, a exposição de seres humanos a doses elevadas pode causar salivação, dor abdominal, náusea, vômito e diarreia, ou o aparecimento de manifestações mais graves como anemia hemolítica, insuficiência renal aguda, cirrose hepática e morte (Georgopoulos *et al.*, 2001). Doses reduzidas afetam sobretudo o TGI, com o aparecimento de náusea, vômito, diarreia para além de dor de cabeça (WHO, 2004). Na água para consumo, o valor de referência de cobre em Portugal é 2 mg/L (Decreto-Lei 152/2017, de 7 de Dezembro).

Os furões, felinos domésticos e algumas raças de ovinos e de canídeos apresentam maior sensibilidade ao cobre relativamente a outros mamíferos, acumulando concentrações tóxicas deste metal, particularmente no fígado (Linder & Hazegh-Azam, 1996). A hepatite associada ao cobre é uma doença hepática crónica bem descrita em canídeos (Rodrigues, 2018), associada a determinadas raças, nomeadamente Pinscher, Skye terrier, Dálmata,

Labrador, Keeshond, Cocker Spaniel Americano, sendo ainda de referir a maior sensibilidade dos gatos de raça siamesa (Santana *et al.*, 2014).

Em ovinos, a exposição a cobre em excesso na água de bebida pode levar a lesões renais, sendo considerado nefrotóxico. Pode ainda estar na origem de anemia, gastrite e enterite. No quadro crónico, este elemento é acumulado em vários tecidos, principalmente no fígado, sem sinais clínicos durante alguns meses. Após uma situação de *stress*, ocorre a libertação do cobre armazenado no fígado, causando um quadro hemolítico e insuficiência renal aguda (Miguel *et al.*, 2013).

O excesso de cobre na água representa um fator de risco para espécies aquáticas, causando desregulação endócrina em peixes (Handy, 2003).

Há ainda estudos de exposição experimental de ratos e búfalos, que apontam para a ocorrência de fotossensibilização relacionada com a hepatotoxicidade (Santana *et al.*, 2014).

2.4.8. Zinco

O zinco (Zn) é um nutriente essencial para a sobrevivência dos organismos. A presença de Zn nos solos está fortemente relacionada com atividades antropogénicas devido à sua elevada gama de aplicações, nomeadamente na indústria automóvel, cosméticos, revestimentos anticorrosivos e ligas metálicas (Padeiro, 2014).

Em seres humanos, a intoxicação por Zn é pouco comum, não havendo um valor de referência estabelecido na legislação mais recente para a água para consumo humano. Contudo, o valor de 5,00 mg/L foi apontado como referência em 1998 (Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto).

Quando ocorre intoxicação, é geralmente por exposição a níveis muito elevados de Zn, afetando principalmente o TGI, provocando vômito e diarreia (Liu *et al.*, 2008), estando também relatados casos de hematuria, icterícia, anemia, insuficiência hepática e renal (Duruibe *et al.*, 2007).

Intoxicação por zinco parece ser pouco comum em mamíferos, embora possa ocorrer em canídeos, furões, ovinos, bovinos, suínos e equinos, não estando descrita em felinos domésticos (Poppenga, 2011). A consequência mais frequente nos casos relatados foram sintomas de deficiência de cobre (WHO, 2003b) como anemia microcítica e hipocrômica refratária à suplementação com Fe e anomalias ósseas (Liu *et al.*, 2008). Em ratos, uma dieta com valores elevados de Zn induz hipocalcémia e reabsorção óssea (WHO, 2003b).

Em casos agudos, após ingestão de sais de Zn, podem também ocorrer lesões locais corrosivas no TGI, seguidas de lesões no fígado, rins e pâncreas. Em aves, os sinais são variáveis e pouco específicos, tais como letargia, anorexia, regurgitação, diarreia hemorrágica, convulsão e morte súbita (Poppenga, 2011).

2.4.9. Selénio

O selénio (Se) está presente na crosta terrestre e nos seres vivos (Seixas & Kehrig, 2007) e é-lhe atribuída uma ambiguidade biológica: em concentrações traço a moderadas é necessário para o crescimento e desenvolvimento do organismo e em concentrações elevadas pode resultar em efeitos tóxicos (Hamilton, 2004 citado por Seixas & Kehrig, 2007).

Entre os elementos essenciais, o selénio é considerado o mais tóxico uma vez que a diferença existente entre a dose recomendada e a tóxica é muito pequena (Chapman, 1999 citado por Seixas & Kehrig, 2007). A biodisponibilidade e o potencial tóxico dos compostos de selénio vão depender da sua forma química e, principalmente, da sua solubilidade (Liu *et al.*, 2008). O selénio ocorre na natureza e nos sistemas biológicos como selénio elementar (Se^0), aparentemente inofensivo, e na forma de seleneto (Se^{2+}), selenato (Se^{6+}) e selenito (Se^{4+}), formas orgânicas e tóxicas para os sistemas biológicos (Wachowicz *et al.*, 2001).

O selénio pode estar presente na natureza devido à erosão das rochas com selenito e selenato, associados com minerais de enxofre. Outras fontes são a atividade vulcânica, poeiras provenientes da queima do carvão e uso de fertilizantes com selénio na sua composição (Barbosa, 2016).

Na água para consumo humano, o limite para o Se é de 0,010 mg/L (Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro).

Na espécie humana, os sintomas presentes numa intoxicação por Se são cefaleias (Barbosa, 2016), náusea, vômito seguido por edema pulmonar e colapso cardiovascular (Liu *et al.*, 2008). Numa intoxicação crónica, a toxicidade manifesta-se essencialmente por efeitos dermatológicos e neurológicos, destacando-se a perda de cabelo e unhas, descoloração dentária, dormência, hemiplegia e paralisia (Liu *et al.*, 2008; Barbosa, 2016).

As plantas variam na sua capacidade de acumulação de selénio, havendo conhecimento de intoxicações em bovinos, ovinos, equinos e suínos, por ingestão de plantas acumuladoras (Oliveira, França, Viviana, Nogueira & Peixoto, 2007). Em animais de produção, Radostits e colaboradores (2007), associam a intoxicação aguda com erosão química da mucosa do TGI, dispneia, anorexia, diarreia aquosa, febre, taquicardia, postura e andar rígidos, prostração e morte.

A toxicidade crónica manifesta-se por emaciação, mau estado do pelo, prostração, postura rígida, claudicação, deformação e queda de cascos. Pode ocorrer alopecia, em bovinos e equinos, na base da cauda, ou esta pode ser generalizada em suínos, caprinos e equinos. As deformações nos cascos podem ser congénitas, ocorrendo em animais recém-nascidos, e estar associadas, e.g. em suínos, a lesões hemorrágicas com membros afetados. Também em suínos, estão relatados casos de paraplegia e quadriplegia secundárias a poliomielomalácia, necrose da banda coronária, baixa taxa de concepção e aumento de mortalidade neonatal (Radostits *et al.*, 2007).

2.4.10. Ferro

O ferro (Fe) é o segundo metal mais abundante da crosta terrestre. Na sua forma elementar é raramente encontrado na natureza (WHO, 2003a), mas tem uma grande capacidade de formar uma variedade de complexos com ligandos orgânicos de forma dinâmica e flexível (Papanikolaou & Pantopoulos, 2005). Nos sistemas biológicos, o Fe pode existir como Fe²⁺ e Fe³⁺ e é essencial para diversos processos biológicos tais como eritropoiese, formação de hemoglobina, mioglobina e vários grupos de enzimas (Liu *et al.*, 2008).

Segundo a WHO (2003a) o Fe e os seus compostos são utilizados em tintas, plásticos, materiais de construção, canalizações, corantes alimentares, no tratamento de águas e ainda como suplemento alimentar ou sob a forma de medicamento em animais, incluindo o Homem.

Segundo o Decreto-Lei 152/2017, de 7 de Dezembro, na água para consumo humano, o Fe deve respeitar o valor indicador de 0,2 mg/ L.

Em seres humanos, a causa mais comum de intoxicação ocorre em crianças que ingerem suplementos de ferro (Poppenga, 2011). Sintomas de intoxicação aguda incluem depressão, taquipneia (WHO, 2003a), vômito, diarreia, dor abdominal, cianose, acidose metabólica (Liu *et al.*, 2008), coma, convulsões e paragem cardíaca (WHO, 2003a; Liu *et al.*, 2008).

O excesso de Fe está associado a um maior risco de aparecimento de tumores, relacionado com a capacidade do Fe de promover stress oxidativo nas células (Huang, 2003 citado por Papanikolaou & Pantopoulos, 2005).

Em canídeos, a ingestão de Fe em excesso manifesta-se de forma semelhante à dos seres humanos, com etapas relativamente bem definidas. Numa fase inicial, até 6 horas após a exposição, o TGI é afetado, provocando vômito e diarreia hemorrágica. Após uma aparente suavização dos sintomas, 6 a 24 horas após exposição, dá-se um agravamento do quadro clínico, com vômito, diarreia, depressão, hemorragia gastrointestinal, dor abdominal, choque circulatório, tremores, acidose metabólica, coagulopatias e, por vezes, morte. A última fase, 2 a 6 semanas depois, é caracterizada por obstrução no TGI, secundária a fibrose devido às lesões provocadas anteriormente (Poppenga, 2011).

Qualidade da água nas zonas de abeberamento na área de reintrodução do lince ibérico (*Lynx pardinus*) em Portugal: estudo preliminar sobre a presença de cádmio, chumbo, ferro, cobre e zinco

3. Objetivos

O principal objetivo deste projeto é a realização de um estudo preliminar sobre a presença de cádmio, chumbo, ferro, cobre e zinco nas zonas de abeberamento da Área de Reintrodução do Lince Ibérico (*Lynx pardinus*) em Portugal, através da recolha e análise de amostras de água doce de superfície.

Como objetivo secundário, pretende-se comparar os valores obtidos para os referidos metais com os valores de referência da água para consumo humano.

4. Material e Métodos

4.1. Identificação da área geográfica em estudo;

Identificação do limite geográfico, abrangendo as áreas de maior interesse, através da maior frequência de sinais de utilização pelos lincos, reintroduzidos ou outros.

4.2. Seleção dos pontos de colheita;

A informação disponibilizada pela equipa de campo do ICNF, recolhida através de fotoarmadilhagem, vestígios e observações diretas dos animais será a base para estabelecer quais as áreas vitais dos vários animais e, conseqüentemente, quais os pontos de água com maior probabilidade de serem os locais de abeberamento.

4.3. Colheita, preservação e acondicionamento de amostras;

Para a colheita, preservação e acondicionamento de amostras, foi desenvolvido, especificamente para este estudo, o “Protocolo de colheita e conservação de amostras de água para análise de metais pesados” (Anexo 1), tendo em atenção as peculiaridades do presente projeto e eventuais dificuldades específicas da colheita de amostras. O protocolo foi depois seguido na amostragem efetuada.

Nos pontos de amostragem selecionados serão efetuadas duas séries de colheitas, em dois períodos temporais distintos. O intervalo de tempo entre colheitas será de aproximadamente um mês, devido a constrangimentos relacionados com o período de estágio.

As amostras serão identificadas com um código alfanumérico, em que a *letra* representa o tipo/ local de colheita e o *número* a ordem cronológica da colheita.

4.4. Determinações Químicas;

A deteção e eventual quantificação dos metais selecionados para este estudo preliminar (cobre, chumbo, cádmio, ferro e zinco), estava inicialmente programada para ser realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. No entanto, problemas de ordem técnica, numa fase tardia do projeto, obrigaram a que fossem efetuadas num laboratório externo, o Laboratório de Análises Químicas do Instituto Superior Técnico (LAIST) da Universidade de Lisboa. Para as determinações serão seguidas as técnicas de análise do LAIST:

- Espectroscopia de Absorção Atómica (AAS) em câmara de grafite - para fração total de cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu);
- Espectroscopia de Emissão em Plasma (ICP) – para ferro (Fe) e zinco (Zn).

4.5. Análise de resultados

Os resultados serão compilados em tabela. Sempre que apropriado serão calculados os valores relativos e/ou funções estatísticas.

Os valores de referência da água de bebida para consumo humano, para comparação direta com os valores encontrados, serão os constantes na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de referência dos metais analisados.

Elemento	Valor de Referência (mg/L)	<i>Fonte do Valor de Referência</i>
Cádmio	0,005	Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro
Chumbo	0,010	Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro
Cobre	2,000	Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro
Ferro	0,200	Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro
Zinco	5,000	Decreto-Lei 236/98, 1 de Agosto

5. Resultados

5.1. Identificação e caracterização da área geográfica

A Área de Reintrodução do Lince Ibérico (ARLI) inclui: o Parque Natural do Vale do Guadiana, *Sítio de Importância Comunitária* da Rede Natura 2000 e territórios envolventes. Nesta área os territórios com mais evidências da presença de lince, situam-se nos concelhos de Mértola, Serpa, Castro Verde e, embora em menor quantidade, Almodôvar.

Como referido anteriormente, de um modo geral, a paisagem desta área é dominada por zonas de planície onde se destacam os matos de esteva (*Cistus ladanifer*) e montado de sobreiro (*Quercus suber*) ou de azinheira (*Quercus rotundifolia*), relevos residuais e vales onde correm os cursos de água. Os solos são bastante rochosos e as produções agrícolas são pouco numerosas, destacando-se a produção de cereais, oliveiras e girassol. Estão ainda presentes na área várias minas abandonadas, já mencionadas anteriormente, como a mina de São Domingos, Montinho, Ferragudo, Balança e Barrigão e Neves Corvo, a única mina ainda ativa na FPI.

Devido ao clima tipicamente mediterrâneo, verifica-se uma variação muito significativa do escoamento, sendo observadas grandes variações do caudal nos vários cursos de água. A diminuição do caudal torna-se crítica nos meses de Verão, devido à seca, onde os pontos de água disponíveis para a fauna selvagem são muito reduzidos, ocorrendo mesmo o desaparecimento de grande parte das charcas e ribeiras.

As massas de água existentes incluem charcas, albufeiras, ribeiras e o rio Guadiana. Dos seus vários afluentes, é de destacar a Ribeira de Oeiras (Figura 7), que atravessa grande parte do território dos lince, no concelho de Mértola.

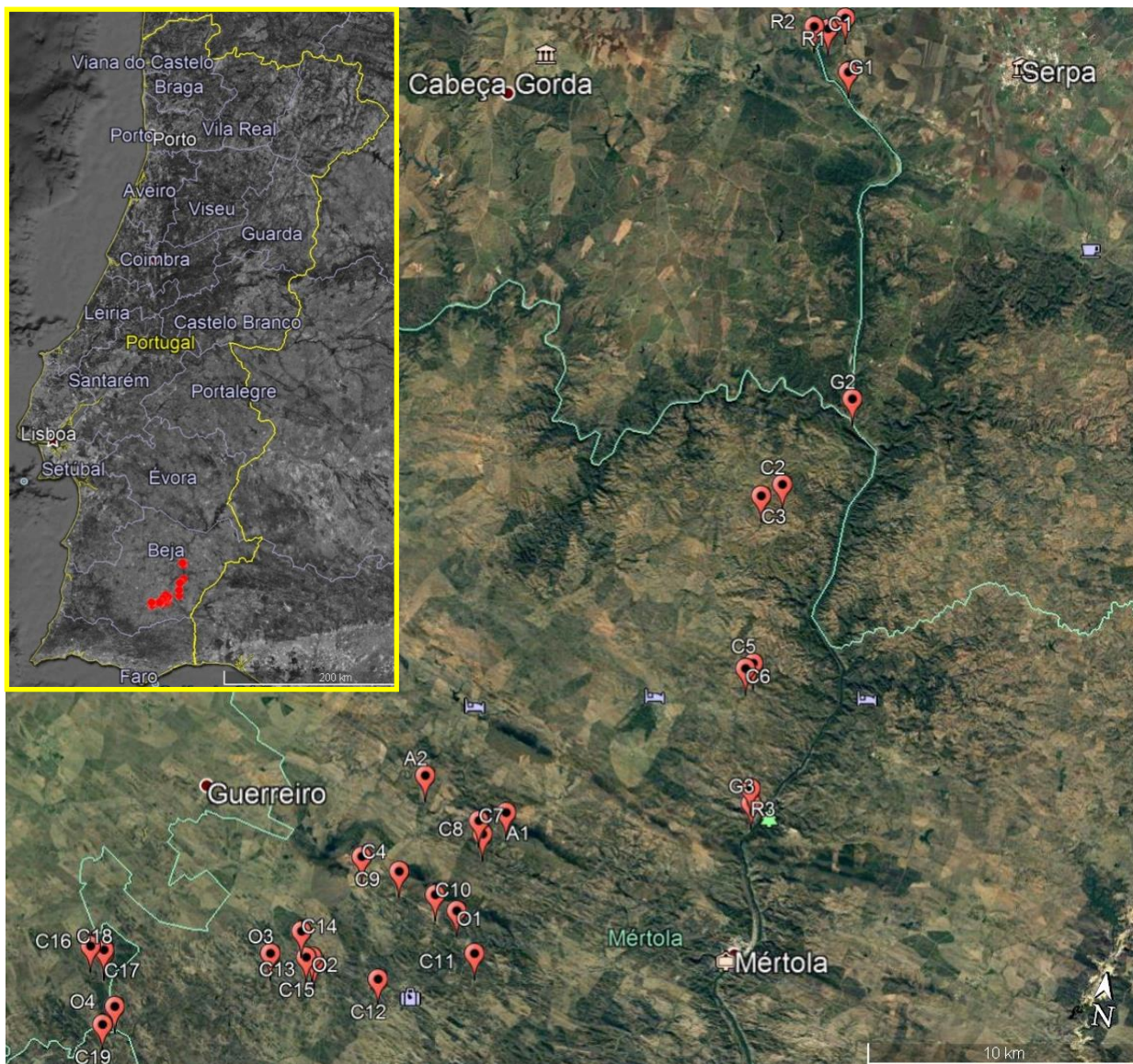
Figura 7: Ribeira de Oeiras, Mértola (original).



5.2. Seleção dos pontos de colheita

Através da informação disponibilizada pela equipa de campo do ICNF foram selecionados 31 pontos de colheita, assinalados a vermelho na Figura 8, que abrangeram 19 charcas ou albufeiras, 5 ribeiras e o rio Guadiana.

Figura 8: Representação geográfica dos pontos de colheita de amostras.



Legenda: C – Charca, G – Rio Guadiana, R – Ribeiro, A – Ribeira de Alvacar, O – Ribeira de Oeiras.

Em algumas charcas e albufeiras foram observados, durante a colheita de amostras, peixes, anfíbios, aves e, junto das margens, vestígios (fezes e pegadas) de cervídeos, lontra e linco, o que confirmou a utilização desses locais pela fauna silvestre (Figura 9).

Figura 9: Latrina de lince e coelho-bravo, Mértola (original).



5.3. Colheita, preservação e acondicionamento de amostras

A amostragem realizou-se em dois pontos temporais distintos, separados com um mês de intervalo: maio e junho.

A primeira recolha foi realizada em maio de 2018 (Tabela 2), num total de 31 amostras. O mesmo procedimento foi repetido nos mesmos locais nos dias 18, 19 e 20 de junho de 2018 (Tabela 3), obtendo um total de 62 amostras.

Destas 62 amostras, 51 foram colhidas como amostras compostas de água (ver anexo I) a cerca de 10 cm e 50 cm de profundidade, em proporção idêntica, e 11 amostras simples (ver anexo I), colhidas a cerca de 10 cm de profundidade. As amostras simples foram colhidas em locais de difícil acesso ou cujo caudal não permitiu a colheita de uma amostra composta. No sentido de facilitar a identificação da amostra durante a análise química, a cada código alfanumérico foi atribuído um número de ordem sequencial (“numero de amostra” nas tabelas 2 e 3).

As amostras foram acidificadas a um $\text{pH} < 2$ imediatamente após a colheita para prevenir a ocorrência de fenómenos de adsorção e de precipitação de metais, assim como o fim da atividade bacteriana, e consequente conservação das amostras. Estas foram mantidas à temperatura ambiente, até à sua análise.

Nas amostras da primeira série (nº de amostra 1 a 31) o pH inicial estava fora do espectro das fitas disponíveis (pH 1-5) pelo que não foi possível determinar o valor inicial.

Tabela 2: Amostras colhidas no mês de maio de 2018.

Nº da Amostra	Código da Amostra	Data	Local	Profundidade de colheita
1	C19 (Charca 19)	14/5/18	Nossa Senhora de Padrões, Almodôvar	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
2	O4 (Ribeira de Oeiras 4)	14/5/18	Nossa Senhora de Padrões, Almodôvar	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
3	C16 (Charca 16)	14/5/18	São Marcos da Ataboeira, Castro Verde	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
4	C17 (Charca 17)	14/5/18	São Marcos da Ataboeira, Castro Verde	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
5	C18 (Charca 18)	14/5/18	São Marcos da Ataboeira, Castro Verde	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
6	O3 (Ribeira de Oeiras 3)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
7	O2 (Ribeira de Oeiras 2)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
8	C13 (Charca 13)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
9	C15 (Charca 15)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
10	C14 (Charca 14)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
11	C4 (Charca 4)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
12	C8 (Charca 8)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm (Amostra simples)
13	C7 (Charca 7)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
14	A1 (Ribeira de Alvacar 1)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
15	C9 (Charca 9)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
16	C10 (Charca 10)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
17	O1 (Ribeira de Oeiras 1)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
18	C11 (Charca 11)	14/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
19	C12 (Charca 12)	15/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
20	C3 (Charca 3)	15/5/18	Mértola, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
21	C2 (Charca 2)	15/5/18	Mértola, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
22	C6 (Charca 6)	15/5/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
23	C5 (Charca 5)	15/5/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
24	R3 (Ribeiro 3)	15/5/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
25	G3 (Rio Guadiana 3)	15/5/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm (Amostra Simples)
26	A2 (Ribeira de Alvacar 2)	15/5/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm (Amostra simples)
27	R1 (Ribeiro 1)	16/5/18	Serpa, Serpa	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
28	C1 (Charca 1)	16/5/18	Serpa, Serpa	10 cm (Amostra simples)
29	G1 (Rio Guadiana 1)	16/5/18	Serpa, Serpa	10 cm / 50 cm (Amostra composta)
30	R2 (Ribeiro 2)	16/5/18	Serpa, Serpa	10 cm (Amostra simples)
31	G2 (Rio Guadiana 2)	16/5/18	Mértola, Mértola	10 cm (Amostra simples)

Tabela 3: Amostras colhidas no mês de junho de 2018.

Nº da Amostra	Código da Amostra	Data	Local	Profundidade de colheita	pH inicial
32	C16 (Charca 16)	18/06/18	São Marcos da Ataboeira, Castro Verde	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6.5
33	C18 (Charca 18)	18/06/18	São Marcos da Ataboeira, Castro Verde	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6.5
34	C17 (Charca 17)	18/06/18	São Marcos da Ataboeira, Castro Verde	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	5.5
35	O4 (Ribeira de Oeiras 4)	18/06/18	Nossa Senhora de Padrões, Almodôvar	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
36	C19 (Charca 19)	18/06/18	Nossa Senhora de Padrões, Almodôvar	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
37	O2 (Ribeira de Oeiras 2)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6.5
38	C15 (Charca 15)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	8
39	O3 (Ribeira de Oeiras 3)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	5.5
40	C13 (Charca 13)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	7
41	C4 (Charca 4)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
42	A1 (Ribeira de Alvacar1)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	7.5
43	C8 (Charca 8)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm (Amostra simples)	6.5
44	A2 (Ribeira de Alvacar 2)	18/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm (Amostra simples)	6
45	C12 (Charca 12)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	5.5
46	C14 (Charca 14)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
47	C9 (Charca 9)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
48	C10 (Charca 10)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	7.5
49	O1 (Ribeira de Oeiras 1)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
50	C11 (Charca 11)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
51	C7 (Charca 7)	19/06/18	São João dos Caldeireiros, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	5.5
52	C3 (Charca 3)	19/06/18	Mértola, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6.5
53	C2 (Charca 2)	19/06/18	Mértola, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
54	C6 (Charca 6)	19/06/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	5.5
55	C5 (Charca 5)	19/06/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	5
56	R3 (Ribeiro 3)	19/06/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
57	G3 (Rio Guadiana 3)	19/06/18	Corte Gafo de Baixo, Mértola	10 cm (Amostra simples)	6
58	G2 (Rio Guadiana 2)	19/06/18	Mértola, Mértola	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
59	R1 (Ribeiro 1)	20/06/18	Serpa, Serpa	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6.5
60	C1 (Charca 1)	20/06/18	Serpa, Serpa	10 cm (Amostra simples)	7
61	G1 (Rio Guadiana 1)	20/06/18	Serpa, Serpa	10 cm / 50 cm (Amostra composta)	6
62	R2 (Ribeiro 2)	20/06/18	Serpa, Serpa	10 cm (Amostra simples)	7

5.4. Preservação e acondicionamento das amostras

O protocolo de colheita, preservação e acondicionamento de amostras elaborado para este estudo (Anexo I) foi seguido em ambas as séries de amostragem, ilustrando a figura 10 o procedimento efetuado imediatamente após a colheita (adição de ácido nítrico para obtenção de $\text{pH} < 2$). No final de cada dia de colheitas os frascos foram transportados para o CNRLI, ficando as amostras armazenadas à temperatura ambiente até serem transportadas para o laboratório onde foram realizadas as análises.

Figura 10: Processamento de uma amostra no campo (fotografia por David Carvalho).



5.5. Determinações Químicas

Apesar do objetivo inicial ser a determinação de todos os elementos em estudo (Cd, Pb, Cu, Fe e Zn) em todas as amostras colhidas, a ocorrência de problemas técnicos acima referidos (Material e Métodos) aliado a constrangimentos temporais e restrições financeiras, obrigou a que fosse feito o refinamento das 62 amostras e dos parâmetros a analisar, de modo a diminuir o número de determinações a realizar.

O refinamento foi baseado em opções que em seguida se elencam e justificam:

- Proximidade temporal - devido à proximidade das duas séries de colheita, considerou-se que não iria ser possível obter informação sobre eventuais flutuações das concentrações dos elementos em análise. As condições meteorológicas mantiveram-se constantes no período de tempo entre as duas séries, não sendo notado alterações volumétricas nos caudais e/ou massas de água, pelo que se optou por realizar a análise apenas das amostras colhidas numa das séries;

- A série escolhida foi a correspondente ao segundo período temporal (“nº de amostra” 32 a 62), tendo em atenção que a informação das amostras estava mais completa (determinação do Ph inicial);

- A seleção dos locais considerou a informação sobre a utilização dos mesmos por lincas e a proximidade de fontes de potencial poluição/contaminação, nomeadamente: mina ativa

de Neves Corvo, minas abandonadas, estradas nacionais, autoestradas e campos agrícolas. Assim, foram seleccionadas 16 amostras de 16 locais (Figura 11).

- Das amostras seleccionadas, em todas (16) foram realizadas as determinações de Cd, Pb, Cu e Fe, e apenas em 4 foi feita a determinação de Zn. Esta seleção considerou as referidas fontes de poluição, mas também os constrangimentos financeiros.

Os métodos analíticos utilizados na determinação, foram a Espectroscopia de Absorção Atómica (AAS) em câmara de grafite para fração total de Cd, Pb e Cu e a Espectroscopia de Emissão Atómica em Plasma (ICP) para o Fe e o Zn. Os limites de quantificação (LQ) das técnicas utilizadas encontram-se discriminados na tabela 4.

Tabela 4: Limites de quantificação dos elementos analisados.

Elemento	Cádmio	Chumbo	Cobre	Ferro	Zinco
Limite de quantificação (mg/L)	0,002	0,006	0,004	0,020	0,100

Os valores obtidos nas determinações químicas foram reunidos na tabela 5, onde se incluiu também os valores médios aceitáveis, estipulados referidos na legislação nacional, bem como os limites de quantificação das técnicas analíticas utilizadas.

Tabela 5: Valores de pH inicial, pH final, determinações químicas (Cd, Pb, Cu, Fe e Zn) nas amostras analisadas, valores médios aceitáveis e LQ.

Número Amostra	Código Amostra	pH		Determinações Químicas (mg/L)				
		Inicial	Final	Cd	Pb	Cu	Fe	Zn
34	C17	5,5	<2	<0,002	<0,006	0,004	0,300	<0,100
35	O4	6,0	<2	<0,002	<0,006	0,012	1,300	<0,100
39	O3	5,5	<2	<0,002	<0,006	0,006	0,340	n.a.
40	C13	7,0	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,550	n.a.
42	A1	7,5	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,180	n.a.
47	C9	6,0	<2	<0,002	<0,006	<0,004	1,800	n.a.
49	O1	6,0	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,260	<0,100
50	C11	6,0	<2	<0,002	<0,006	0,004	2,600	n.a.
51	C7	5,5	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,470	n.a.
52	C3	6,5	<2	<0,002	<0,006	<0,004	1,800	n.a.
54	C6	5,5	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,400	n.a.
55	C5	5,0	<2	<0,002	<0,006	0,004	1,100	n.a.
57	G3	6,0	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,170	n.a.
59	R1	6,5	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,056	<0,100
60	C1	7,0	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,610	n.a.
61	G1	6,0	<2	<0,002	<0,006	<0,004	0,820	n.a.
Valores Médios Aceitáveis* (mg/L)				0,005	0,010	2,000	0,200	5,000
Limite de Quantificação (LQ) (mg/L)				0,002	0,006	0,004	0,020	0,100

Legenda e notas:

n.a. – não analisado

* Os valores médios aceitáveis para o Cd, o Pb, o Cu e o Fe estão em conformidade com o Decreto-Lei 306/2007, com a última alteração feita pelo Decreto-Lei 152/2017. O valor para o Zn está conforme o Decreto-Lei 236/98.

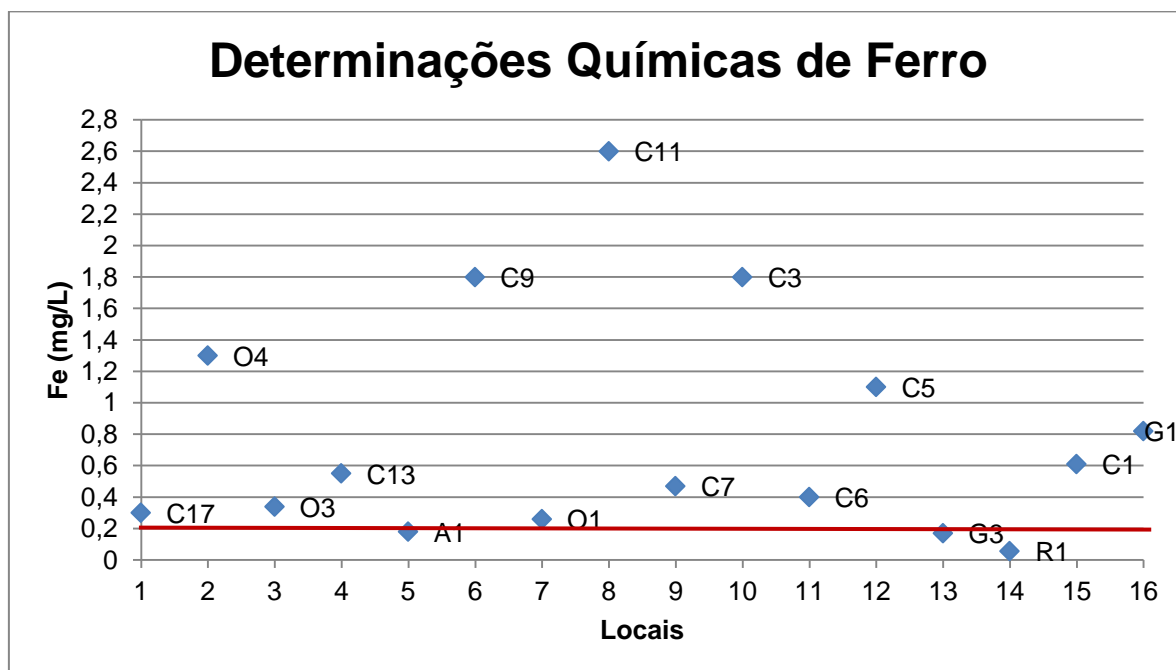
O pH não fez parte das determinações a efetuar neste estudo, tendo estes dados sido coligidos acessoriamente durante o processamento de preservação das amostras na 2ª série de colheita. No entanto observou-se que o pH das amostras variava entre 5,5 e 8. Na água para consumo humano esse valor deverá estar entre os 6,5 e os 9,5 (Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro), tendo sido calculado que 61% das amostras da segunda série (19/31) apresentavam valores inferiores ao limite mínimo de 6.5.

Da observação da Tabela 5 verifica-se que tanto o Cd como o Pb estão abaixo dos valores médios aceitáveis da água para consumo humano em todas as amostras, estando inclusivamente abaixo do limite de quantificação da técnica utilizada. O mesmo acontecendo para todas em todas as amostras em que foi determinado o Zn.

Verifica-se, relativamente ao Cu, que em duas amostras pertencentes à Ribeira de Oeiras (O4 e O3), cujo percurso passa na mina de Neves Corvo, a concentração está acima do limite de quantificação (0,012 e 0,006 mg/L respetivamente), mas abaixo do valor médio aceitável de 2 mg/L.

No que respeita ao Fe, as concentrações são mais dispersas (Figura 11), variando entre o valor mínimo de 0,056 mg/L (R1) e máximo de 2,6 mg/L (C11), e distribuindo-se acima e abaixo do valor listado legalmente de 0,2 mg/L: 3/16 amostras estão abaixo desse valor e 13/16 acima, notando-se que em 4 das 16 amostras são até duas vezes superiores, 4/16 são até cinco vezes superiores, 4/16 são até dez vezes superiores e 1/16 é mais de dez vezes superior ao valor listado legalmente.

Gráfico 1: Determinações químicas de ferro (mg/L) nos locais analisados.



Legenda: Linha (a vermelho) correspondente ao limite legalmente estabelecido (0,2 mg/L).

6. Discussão

No presente estudo, foram colhidas amostras de água doce de superfície em 32 pontos de abeberamento na ARLI. Para 16 destes locais foram determinadas as concentrações de Cd, Pb, Cu, Fe e, em 4 destes pontos, foi também determinada a concentração de Zn.

A seleção dos locais, como referido anteriormente, teve por base a informação sobre a utilização dos mesmos por lince e a proximidade de fontes de potencial poluição/contaminação. As albufeiras e as charcas existentes são de grande utilidade, não só para espécies silvestres, como para também para abeberamento do gado, desempenham funções de retenção de sedimentos e do aumento da infiltração das águas de drenagem e constituem biótopos importantes para a flora e fauna da região.

A seleção dos parâmetros a determinar teve por base os seguintes fatores:

- A maior toxicidade que determinados elementos, como o Cd e o Pb, mesmo em concentrações traço, têm para os seres vivos, podendo ter um impacto dramático no ecossistema;

- As características do solo da área de estudo, que se insere na FPI, o que lhe confere uma grande riqueza de minerais, e.g. Fe;

- A proximidade da área de estudo a potenciais fontes de contaminação, nomeadamente minas abandonadas e a mina ativa de Neves Corvo, que explora atualmente Cu e Zn;

- Os recursos técnicos e financeiros disponíveis, que limitaram o número de parâmetros possíveis de analisar e excluíram, por exemplo, o Hg, que embora fosse de elevado interesse conhecer a sua concentração, pelo impacto que a sua elevada toxicidade pode ter no ecossistema, este necessitaria de condições de análise especiais que estavam fora dos recursos disponíveis, sendo esta limitação válida também na exclusão de outros elementos.

As intoxicações por metais, em qualquer espécie, são geralmente de difícil deteção e raramente quantificadas. A maioria dos metais causa efeitos deletérios em múltiplos órgãos, resultando no decaimento da condição geral, em oposição a mecanismos de ação bem definidos e documentados de outros contaminantes, como os pesticidas. Tipicamente, os dados e valores de referência toxicológicos para espécies selvagens são extrapolados de outras espécies quer sejam domésticas, de laboratório ou mesmo dos seres humanos. No caso dos metais, algumas espécies têm a capacidade os armazenar nos seus tecidos sem experienciarem efeitos tóxicos, o que faz a extrapolação entre espécies potencialmente problemática. No entanto, esta é necessária considerando a escassez de dados específicos para a variedade de espécies existentes, mas deve ser feita com cautela devido à grande quantidade de incerteza que pode ser introduzida no processo de avaliação (Suter, 1993 citado em USEPA, 2007).

Neste trabalho, apesar das amostras do estudo corresponderem a água doce superficial não tratada, foram considerados, para efeitos de comparação, os valores de referência para

a água destinada ao consumo humano, tendo em conta que a água ingerida pelos animais é a que se encontra disponível na natureza e admitindo que os valores considerados recomendáveis e/ou admissíveis para os seres humanos, poderão ser também os considerados aconselháveis para outras espécies animais.

As técnicas analíticas de determinação/quantificação utilizadas neste estudo são as recomendadas internacionalmente (WHO, 2004; WHO, 2003a; WHO, 2003b; WHO, 2011a; WHO, 2011b; WHO, 2011c; WHO, 2011d; Sharma & Tyagi, 2013) e adotadas legalmente em Portugal (Decreto-Lei 236/98, 1 de Agosto), tendo por base a Espectrofotometria de Absorção Atômica (AAS), nas suas variantes de Absorção Atômica em Câmara de Grafite e Emissão Atômica em Plasma (ICP) devido à sua especificidade para deteção de metais em diversas matrizes (água, solo, sedimentos, alimentos) e sensibilidade elevada, necessária para a deteção de elementos traço como é o caso dos metais. O Decreto-Lei 236/98 foi posteriormente revogado pelo Decreto-Lei 152/2017, que entrou em vigor em Janeiro de 2018, apenas indicando quais os requisitos que as técnicas analíticas devem ter, sem as discriminar, não se prevendo contudo que haja alterações, já que o desempenho das mesmas vai ao encontro dos referidos requisitos.

Da observação dos resultados obtidos, sobressai que, para o Cd, o Pb e o Zn, todos os valores estão abaixo do limite de quantificação da técnica utilizada, que é naturalmente mais baixo que o limite recomendado ou aceitáveis para a água de consumo.

Sendo o cádmio um elemento tóxico, o valor de referência na água de bebida é de 0.003 mg/l (JECFA, 2000, citado por WHO, 2011b). Em Portugal, o Decreto-Lei 152/2017, aponta 0,005 mg/L como valor de referência. Em todas as amostras, a concentração encontrava-se abaixo do limite de quantificação de 0.002 mg/L e, como tal, inferior aos valores referenciados nacional e internacionalmente.

Relativamente ao chumbo, sendo o metal mais comum na crosta terrestre, é extremamente difícil conseguir concentrações abaixo de 0.01mg/l em água de bebida, pelo que este é o valor de referência nacional e internacional (WHO, 2011c; Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro). À semelhança do Cd, o Pb das amostras analisadas encontrava-se em valores inferiores ao limite de quantificação de 0.006 mg/L, por sua vez inferior ao valor de referência.

Embora o valor de 2,00 mg/L de zinco em água de bebida tenha sido estabelecido previamente, atualmente a WHO não estabelece um valor de referência. No Decreto-Lei 236/98, é indicado o valor de 5,00 mg/L, mas este não é referido na legislação mais recente. Sabe-se porém que a presença de Zn em concentrações superiores a 3 mg/L tende a dar características organoléticas desagradáveis à água e que em águas de superfície, a concentração de zinco é usualmente inferior a 0.01mg/L (WHO, 2003b). Nas quatro

amostras analisadas, este elemento encontrava-se abaixo do limite de quantificação de 0.1 mg/L, inferior aos limites referidos.

No caso do cobre, a WHO (2004) e o Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro definem o valor de referência em 2,00 mg/L de água de bebida. Das 16 amostras, a sua presença não foi quantificada em 11 para o limite de 0.004 mg/L, encontrando-se nas restantes 5 entre 0.004 mg/L e 0.012 mg/L, ou seja, abaixo do valor de referência. As amostras cuja presença de cobre foi quantificada pertencem à Ribeira de Oeiras, cujo percurso passa na mina ativa de Neves Corvo, ou a charcas perto desta ribeira.

Em relação ao ferro, este foi quantificado em todas as amostras, encontrando-se entre 0.056 - 2.6 mg/L. As intoxicações por ferro são extremamente raras e apenas ocorrem com valores muito elevados, como demonstrado pela dose letal média de ferro para humanos de 200-250 mg/kg de peso corporal. Atualmente, não existe um valor de referência proposto para o Fe na água de bebida, embora se saiba que as concentrações são normalmente inferiores a 0.3 mg/L, com exceção de alguns países (WHO, 2003) e segundo a WHO (2004), concentrações até 2,00 mg/L não apresentam um risco para a saúde. Contudo, a USEPA (2018) estabelece, em *Secondary Drinking Water Regulations* (SDWR), o valor de 0.3 mg/L como referência não obrigatória, acima da qual a presença de ferro na água pode provocar efeitos indesejáveis estéticos (descoloração da pele e dentes) e organoléticos (sabor, odor e coloração da água de bebida). A legislação nacional (Decreto-Lei 152/2017, 7 de Dezembro), aponta também como parâmetro indicador, o valor de 0,2 mg/L para o Fe em água para consumo humano.

O Fe pode ser encontrado em águas superficiais, por exemplo, em rios, em concentrações de 0.7 mg/L e em águas subterrâneas, em meio anaeróbico, entre 0.5 e 10 mg/L, embora concentrações de 50 mg/L já tenham sido encontradas. Regra geral, 1-3 mg/L é considerado aceitável para pessoas que bebem água de meio anaeróbico, isto é extraída de poços (WHO, 2003a).

Nos resultados obtidos, 3 amostras continham um valor inferior ao apontado como referência não obrigatória em Portugal (0.2 mg/L), outras 12 encontravam-se abaixo do valor de 2mg/L, e 1 amostra, pertencendo a uma charca na freguesia de São João dos Caldeireiros, no concelho de Mértola, era superior (2.6 mg/L), mantendo-se, no entanto, inferior a 3mg/L, que é considerado aceitável.

Em suma, embora 13/16 amostras apresentassem valores superiores a 0.2 mg/L, as concentrações de ferro encontradas ainda são consideradas aceitáveis, não podendo ser assumidas como um risco imediato para o ecossistema, embora seja um parâmetro que merece especial atenção. O excesso de ferro pode resultar em alterações na função hepática, patologias endócrinas ou cardiovasculares mas, a intoxicação por ferro requer uma ingestão crónica em grandes quantidades e, a verificar-se em fauna selvagem, é mais

provável que seja subclínica (Sykalima et al., 2001), o que constitui um obstáculo na monitorização da saúde destes animais.

O ferro é o segundo metal mais abundante da crosta terrestre e uma possível explicação para estes valores pode estar relacionada com a própria riqueza mineral da composição dos solos, já referida como habitual na faixa piritosa ibérica, onde se insere a área de estudo. Tal como o próprio nome indica, a pirite (um dissulfureto de ferro FeS_2) é o principal minério de ferro, ocupando cerca de 90% da composição do solo (Moreira et al., 2011).

Face aos resultados obtidos, é necessário refletir sobre vários pontos, nomeadamente o método utilizado para a colheita de amostras. Em lagos ou albufeiras é possível a ocorrência de fenómenos de estratificação térmica originando estratos ou camadas de água com características físicas, químicas e biológicas diferentes, levando a uma grande heterogeneidade na coluna de água. Por isso, os métodos revistos para obtenção de amostras de água para determinação de metais referem que estas devem ser colhidas, em um ou dois pontos na zona mais central da massa de água, dependendo da dimensão desta, quer à superfície quer verticalmente ao longo da coluna de água em um ou mais pontos dependendo da profundidade (Comissão Técnica Reclame [CTR], 2017).

No entanto, a metodologia de colheita pode e deve estar adaptada aos objetivos definidos que, neste estudo, foi obter amostras de água que representassem aquela que um lince, ou outro mamífero terrestre, iria beber e, como tal, foram retiradas junto das margens, onde a água está ativamente em movimento e poderá acumular menos poluentes.

Outro aspeto importante, da técnica de colheita, está relacionado com a tendência que os metais pesados têm para se acumular em plantas, algas, insetos e depositar em partículas, e em sedimentos (Sykalima et al., 2001), podendo estar por isso presentes em menor concentração à superfície da água, onde muitas das amostras foram colhidas. A colheita composta por água superficial, a cerca de 10 cm de profundidade, e água a cerca de 50 cm de profundidade, em proporção semelhante, teve como objetivo integrar o método recomendado para metais pesados, com o objetivo do projeto de amostrar a água de abeberamento, obtendo uma amostra mais representativa. De realçar que a maioria dos locais amostrados apresentavam massas de água de pouca profundidade (< 2m), sendo que em alguns não chegava a 30 cm, no centro da massa de água e, nestes casos, as amostras foram simples, à superfície.

Deve ainda ser tido em atenção que fenómenos de adsorção e desadsorção dos metais dos sedimentos, relacionados com a variação do caudal da massa de água, poderão contribuir de modo não contabilizado para variações da sua concentração na água e da sua disponibilidade para ingestão através do abeberamento. Um futuro estudo que incluísse a determinação química de metais nos sedimentos poderia, não só confirmar esta hipótese, como seria de extrema importância se considerarmos que a fauna selvagem também pode

ser exposta a metais pela ingestão acidental de sedimentos do solo, proporcionalmente mais relevante para herbívoros do que carnívoros e invertebrados (USEPA, 2007) embora, no caso dos felinos, esta via possa ter mais peso pelo seu comportamento natural de *grooming* (Poppenga, 2011).

A colheita de amostras em pontos temporais distintos (Verão e Inverno), inicialmente programada, poderia fornecer resultados preliminares sobre uma eventual flutuação nas concentrações dos elementos num período seco e num período chuvoso. No entanto, a condição meteorológica atípica de 2017/2018, juntamente com outros impedimentos relacionados com a disponibilidade de recursos materiais e humanos necessários para a realização das colheitas, levou a um atraso no primeiro tempo de colheita, realizado apenas no mês de maio, um mês antes do segundo tempo de recolha, em junho. Com efeito, o ano de 2017 foi extremamente quente e seco. O inverno 2017/18 em Portugal Continental foi frio e seco, mantendo-se a situação de seca meteorológica que já se verificava desde abril 2017, até ao final de fevereiro de 2018, onde cerca de 84% do território estava em seca severa e extrema, incluindo o distrito de Beja. Apenas na Primavera ocorreu precipitação que contrariou a situação de seca (Instituto Português do Mar e da Atmosfera [IPMA], 2018). Nos meses de colheita das amostras, os caudais já haviam subido, embora o mês de maio tenha voltado a ser um mês seco (em relação à precipitação), ao contrário de junho, onde voltou a chover. Isto pode significar que os níveis de metais encontrados nas amostras podem ter concentrações diferentes, em outros locais ou tempos de amostragem.

Para se verificar esta hipótese com um nível de fiabilidade e precisão aceitável, é recomendado que a monitorização dos parâmetros indicativos dos elementos de qualidade físico-química deva realizar-se em intervalos não superiores a 3 meses. Estas frequências de monitorização têm em conta a variabilidade dos parâmetros resultante tanto das condições naturais como das condições antropogénicas (Decreto-Lei nº 77/2006, 30 de Março).

Refletindo sobre a necessidade de realizar estudos futuros para uma maior robustez e fiabilidade de resultados, reconhece-se que para a classificação do estado ecológico de massas de água de superfície (rios, lagos, águas costeiras ou artificiais), é necessário a avaliação de um maior leque de parâmetros. Estes incluem a avaliação de elementos biológicos (e.g. composição e abundância da flora aquática, invertebrados, fauna piscícola); elementos hidromorfológicos de suporte dos elementos biológicos (e.g. caudais e condições de escoamento, ligação a massas de águas subterrâneas; condições morfológicas: variação da profundidade e largura; estrutura e substrato do leito); elementos químicos e físico-químicos de suporte dos elementos biológicos (condições térmicas, de oxigenação, salinidade, estado de acidificação e poluentes específicos) (Decreto-Lei n.º 77/2006, 30 de Março).

Considerando este caso específico, onde as águas de superfície são diretamente consumidas pela fauna silvestre e de exploração pecuária, segundo a USEPA (2007), uma avaliação de risco de contaminação da fauna por metais pesados pressupõe uma abordagem complexa, onde uma panóplia de fatores derivados das características específicas dos metais pesados no ambiente e nos sistemas biológicos têm que ser tidas em conta, nomeadamente a ocorrência natural dos metais, as vias de exposição e toxicocinética, as associações e formas químicas de cada metal e a expressão dos seus efeitos nas diferentes espécies, de maneira consistente com limiares de risco definidos. Devido às diferenças significativas nas vias de exposição e toxicocinética dos metais entre invertebrados, plantas e vertebrados, é conveniente o que o método de avaliação seja ajustado para cada grupo.

Outra particularidade é a biodisponibilidade de cada metal e os fenómenos de bioacumulação e biomagnificação, características importantes a ser consideradas numa avaliação. Para ecossistemas terrestres, estes conceitos capturam o potencial dos metais para dois desfechos ecológicos importantes: toxicidade direta para fauna e flora e toxicidade secundária para animais que se alimentam de plantas e de animais contaminados, considerando o potencial trófico dos metais ao longo da teia alimentar, para que a exposição total possa ser calculada, incluindo o que é ingerido através da dieta e o que é ingerido diretamente pelo meio contaminado (solo e água) (USEPA, 2007).

Adicionalmente, a monitorização do controlo de qualidade de água, quando se trata de consumo humano, não se restringe à análise química, e pretende fornecer informações sobre a qualidade organoléptica e microbiológica da água, tendo em vista determinar a conformidade da água com os valores paramétricos que, naturalmente, não se resumem apenas a metais pesados. A água destinada ao consumo humano deve respeitar parâmetros microbiológicos, parâmetros químicos e parâmetros indicadores (Decreto-Lei n.º 152/2017, 7 de dezembro).

Embora os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo preliminar não revelarem motivo de preocupação imediata, entende-se que a monitorização dos pontos de água de abeberamento dos animais silvestres deverá continuar, de modo a que possa ser realizada uma avaliação de risco consistente e continuada com uma metodologia sistemática de análise de perigos e avaliação do risco das várias variáveis referidas, que não se esgotam apenas na análise química.

7. Conclusão e Perspetivas Futuras

Os metais pesados são elementos de elevada toxicidade, mesmo em concentrações reduzidas, pelo que podem ter um grande impacto no ecossistema, uma vez que a exposição reiterada, ainda que a concentrações traço, pode ter consequências no desenvolvimento de várias espécies, bem como no seu sucesso reprodutivo.

O estudo agora apresentado teve como objetivo principal a obtenção de dados quantitativos sobre a existência de Cu, Pb, Cd, Fe e Zn, em pontos de abeberamento do lince ibérico, naquela que é a primeira ARLI em Portugal, incluindo o Parque Natural do Vale do Guadiana, o Sítio de Importância Comunitária da Rede Natura 2000 e territórios envolventes. Os locais foram selecionados tendo por base os dados existentes, obtidos por fotoarmadilhagem e observações diretas e indiretas dos animais.

Conclui-se que em todos os locais analisados, as concentrações de Cd, Pb e Zn, foram inferiores aos limites de quantificação das técnicas analíticas utilizadas (ASS e ICP), o Cu foi superior a esse limite apenas em dois dos locais e que só o Fe apresentou concentrações passíveis de serem quantificadas, em todos os locais analisados. Comparando estes resultados com os limites de referência legalmente estabelecidos para a água para consumo humano, verifica-se que as concentrações de Cd, Pb, Cu e Zn foram inferiores aos referidos limites e as concentrações de Fe, embora superiores, podem ser ainda consideradas aceitáveis.

Estudos futuros deverão ter em atenção não só o tipo de utilização do solo nas proximidades destes pontos como também as condições climatéricas e meteorológicas a que esta zona geográfica está sujeita, sendo desejável a inclusão não só de outros metais, e.g. Hg, como também a análise de outros parâmetros de qualidade da água, aumentando ainda a frequência de amostragem que permita traçar o cenário sazonal mais provável.

De salientar ainda que, apesar da ingestão de água ser um dos modos de exposição mais frequente, não deve ser esquecido que a dieta constitui outro modo de exposição por ingestão, sendo esta de grande relevância no caso de predadores como o lince ibérico, raposa, gato-bravo e aves de rapina, por se alimentarem de consumidores de diversas ordens, o que justifica uma preocupação acrescida e justificativa da inclusão, em futuros estudos, de outras matrizes, nomeadamente plantas, invertebrados e sedimentos.

No caso do lince ibérico, atendendo ao seu frágil estatuto de conservação e à reduzida diversidade genética da espécie, que deixa estes animais particularmente vulneráveis a fatores de stress ambiental, o conhecimento sobre o seu habitat é essencial, e a realização de novos projetos deve ser incentivada. Tal como refere Carreira (2018) só através da compreensão do ecossistema na sua globalidade e de um contínuo esforço multidisciplinar será possível iniciar uma abordagem proactiva nas políticas de conservação que permita a preservação da riqueza da fauna e flora.

8. Bibliografia

Álvarez-Valero, A.M., Pérez-López, R., Matos, J., Capitán, M.A., Nieto, J.M., Sáez, R., Delgado, J. Caraballo, M. (2008). Potential environmental impact at São Domingos mining district (Iberian Pyrite Belt, SW Iberian Peninsula): evidence from a chemical and mineralogical characterization. *Environmental Geology*, 55, 1797–1809.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2004). *Toxicological profile for copper*. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA, US: ATSDR.

Barbosa, C.H.V. (2016). *Alimentos e suplementos alimentares contendo selénio: riscos e benefícios*. Dissertação de mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M. & Srivastava, S. (2012). *Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals*. *The Journal of Environmental Management*, 105, 103–120.

Buekers, J., Steen, R.E., & Smolders, E. (2009). Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Science of the Total Environment*, 407(11), 3431–3438.

Cardoso, A.C., Rocha, P., Fialho, S., Farinha, J.C., Rito, P., & Silva, E. (2008). Plano de gestão do vale do Guadiana. In Instituto de Conservação da Natureza e Biodiversidade, *Parque Natural do Vale do Guadiana e Zona de Protecção Especial do Vale do Guadiana*. Mértola: ICNB.

Carreira, S.F. (2018). *Programa de conservação ex situ de lynx pardinus (Temminck, 1827): avaliação da eficácia do protocolo de medicina preventiva no controlo da carga parasitária no lince ibérico e sua presa Oryctolagus cuniculus (Linnaeus, 1758) no centro nacional de reprodução do lince ibérico, em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Comissão Técnica Reclare (CTR) (2017). Guia Relacre 28, Amostragem de Águas. RECLARE, 978-972-8574-42-0

Crespo, C., Gañán, N., Pulido, L., Osuna, G., Gomendio, M., & Roldán, E.R. (2007). *Conservación de tejidos y células de lince ibérico (Lynx pardinus), lince boreal (L. lynx) y lince rojo (L. rufus) para el establecimiento de un banco de recursos genéticos*. Galemys: Boletín SECEM.

Decreto-Lei nº 19/93 de 23 de Janeiro. Diário da República nº 19/93. I-Série A, pp 271 - 277. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais. Estabelece normas relativas à Rede Nacional de Áreas Protegidas.

Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto. Diário da República n.º 176/1998. I-Série A, pp 3676 – 3722. Ministério do Ambiente. Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Revoga o Decreto-Lei n.º 74/90, de 7 de Março.

Decreto-Lei nº186/99 de 31 de Maio. Diário da República n.º 126/1999, Série I-A, pp 3107 – 3109. Ministério da Economia. Estabelece as disposições aplicáveis à cessação da comercialização da gasolina com chumbo e à disponibilização, aos consumidores, de produtos que a substituam, bem como as disposições aplicáveis às características desses produtos.

Decreto-Lei nº 384-B/99 de 23 de Setembro. Diário da República nº 223/99 – I Série A, pp 6644-(2) a 6644-(23). Ministério do Ambiente. Cria diversas zonas de protecção especial e revê a transposição para a ordem jurídica interna das Directivas n.os 79/409/CEE, do Conselho, de 2 de Abril, e 92/43/CEE, do Conselho, de 21 de Maio.

Decreto-Lei n.º 77/2006 de 30 de Março. Diário da República n.º 64/2006, Série I-A, pp 2331 – 2354. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Complementa a transposição da Directiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água, em desenvolvimento do regime fixado na Lei n.º 58/2005, de 29 de Dezembro.

Decreto-Lei nº152/2017 de 7 de dezembro. Diário da República n.º 235/2017, Série I, pp 6555 – 6576. Ambiente. Altera o regime da qualidade da água para consumo humano, transpondo as Diretivas n.os 2013/51/EURATOM e 2015/1787.

Decreto Regulamentar nº 28/95 de 18 de Novembro. Diário da República nº 267/95 – I Série B, pp 7111 – 7113. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais. Cria o Parque Natural do Vale do Gadiana.

Duruibe, J.O.I., Ogwuegbu, M.O.C., & Egwurugwu, J.N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Science*, 2 (5), 112-118.

Fernandes, C.J. (2012). *Identificação e selecção de biomarcadores para avaliação do risco de exposição ao arsénico*. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Lisboa: Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa.

Ferreras, P., Beltrán, J.F., Aldama, J.J. & Delibes, M. (1997). Spatial organization and land tenure system of the endangered iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Zoology*, 243: 163-189.

Ferreras, P., Rodriguez, A., Palomares, F. & Delibes, M. (2010). Iberian Lynx: the uncertain future of a critically endangered cat. In D. Macdonald & A. Loveridge. *The Biology and Conservation of wild felids* (pp.507-520). Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

Fine, B.P., Vetrano, T., Skurnick, J., & Ty, A. (1988). Blood pressure elevation in young dogs during low-level lead poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 93: 388-393.

Georgopoulos, P.G., Roy, A., Yonone-Lioy, M.J., Opiekun, R.E., & Lioy, P.J. (2001). Environmental copper: Its dynamics and human exposure issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 4(4), 341–394.

Giulio, R.D. & Newman, M.C. (2015). Applications of toxicology: Ecotoxicology. In C.D. Klaassen & J. B. I. Watkins, *Casarett & Doull's essentials of toxicology* (3ªed.).(pp.441-450) New York: McGraw-Hill Medical.

Guzmán, J.N., García, F., Garrote, G., Ayala, R. & Iglesias, C. (2005). El lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España y Portugal. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad.

Hamir, A.N., Sullivan, N.D., Handson, P.D., Wilkinson J.S. & Lavelle, R.B. (1981). Clinical signs, radiology, and tissue lead distribution of dogs administered a mixture of lead chloride, lead bromide, and lead sulfate. *Australian Veterinary Journal*, 57: 401-406.

Hamir, A.N., Sullivan, N.D. & Handson, P.D. (1984). Neuropathological lesions in experimental lead toxicosis of dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 94: 215- 232.

Handy, R.D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: Two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 135: 25-38.

Hawkes, J.S. (1997). Heavy Metals. *J. Chem. Educ.*, 74(11): 1374.

Hejna, M., Gottardo, D., Baldi, A., Dell'Orto, V., Cheli, F., Zaninelli, M., & Rossi, L. (2017). Review: Nutritional ecology of heavy metals. *Animal*, 1: 1–15.

Hernández, L.M., González, M.J., Rico, M.C., Fernández, M.A. & Baluja, G. (1985). Presence and biomagnification of organochloride pollutants and heavy metals in mammals of Doñana National Park (Spain), 1982–83. *J. Environ. Sci. Health*, 20: 633–50.

Hunter, B.A., Johnson, M.S., Thompson, D.J. (1989). Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem, tissue distribution and ageaccumulation in small mammals. - *Journal of Applied Ecology*, 26: 89-99.

Iberlince (2018). *Distribuição: distribuição histórica e atual do lince ibérico*. Acedido em Agosto. 21, 2018, disponível em <http://www.iberlince.eu/index.php/port/lince-iberico/distribuicao#.W3wrc5KjIU>

Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade (ICNB) (2005a). *Plano Sectorial da Rede Natura 2000, Fauna, Aves*. Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade, Lisboa.

Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade (ICNB) (2005b). *Plano Sectorial da Rede Natura 2000, Fauna, Mamíferos*. Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade, Lisboa.

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) (2018a). O lince ibérico: caracterização da espécie. *Habitat*. Acedido em Ago. 29, 2018, disponível em: <http://areasprotegidas.icnf.pt/lince/index.php/lince-iberico/caracteriza-especie/habitat>

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) (2018b). *Parque Natural do Vale do Guadiana. Classificação/Caracterização*. Acedido em Ago. 22, 2018, disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/p-nat/pnvg/class-carac>

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) (2018c). *Parque Natural do Vale do Guadiana. Fauna*. Acedido em Ago. 22, 2018, disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/p-nat/pnvg/fauna>

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) (2018d). *Parque Natural do Vale do Guadiana. Geologia. Hidrologia. Clima*. Acedido em Ago. 22, 2018, disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/p-nat/pnvg/geo>

Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P. (2018). *Balanço Climático Preliminar do Ano 2017 Portugal Continental*. Lisboa: IPMA.

Johnson, W.E. & O'Brien, S.J., (1997). Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *J Mol Evol*, 44(1): 98–116.

Johnson, W.E., Godoy, J.A., Palomares, F., Delibes, M., Fernandes, M., Revilla, E. & O'Brien, S.J. (2004). Phylogenetic and Phylogeographic Analysis of Iberian Lynx Populations. *The American Genetic Association, Journal of Heredity*, 95(1):19–28.

Laneiro, C.F.M. (2012). *Avaliação Da Biodisponibilidade De Metais Em Solos Contaminados Por Atividades Mineiras: Métodos Químicos, Bioquímicos E Ecotoxicológicos*. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Beja: Instituto Politécnico de Beja.

Lecoq, N.J. (2002). *Unidades de Paisagem da zona de Castro Verde-Mértola: contributos para uma gestão ambiental eficiente*. Dissertação de Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologias – Universidade Nova de Lisboa.

LifelImperial (2018): *Conservação da Águia-Ibérica-Imperial em Portugal: Biologia*. Acedido em Ago. 25, 2018. Disponível em: <http://www.lifeimperial.lpn.pt/pt/biologia>

Linder, M.C. & Hazegh-Azam, M. (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63: 797–811.

Liu, J., Goyer, R.A. & Waalkes, M.P. (2008). Toxic agents: toxic effects of metals. In C.D. Klaassen, L. J. Casarett & J. Doull. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons* (7^a ed.). (pp. 931-979) New York: McGraw-Hill Education / Medical.

López, G., López-Parra, M., Fernández, L., Martínez-Granados, C., Martínez, F., Meli, M.L., Gil-Sánchez, J.M., Viqueira, N., Díaz-Portero, M.A., Cadenas, R., Lutz, H., Vargas, A. & Simón, M.A. (2009). Management measures to control a feline leukemia virus outbreak in the endangered Iberian lynx. *Animal Conservation*, 1–10.

López, G., López-Parra, M., Garrote, G., Fernández, L., Rey-Wamba, T., Arenas-Rojas, R., García-Tardío, M., Ruiz, G., Moral, M. (2014). Evaluating mortality rates and causalities in a critically endangered felid across its whole distribution range. *Eur. J. Wildl Res.* DOI 10.1007/s10344-013-0794-8

Lynxexsitu (2018a): Programa de Conservação del lince ibérico: centro de criação. Acedido em Ago, 30, 2018, disponível em <https://www.lynxexsitu.es/programa-por.php?sec=centro>

Lynxexsitu (2018b): Programa de Conservação del lince ibérico: Ex-situ Programa. Acedido em Ago, 30, 2018, disponível em <https://www.lynxexsitu.es/programa-por.php?leng=pt>

Ma, L.Q., & Rao, G.N. (1997). Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 26(1), 259–264.

Ma, W., Denneman, W., & Faber, J. (1991). Hazardous Exposure of Ground-Living Small Mammals to Cadmium and Lead in Contaminated Terrestrial Ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20(2), 266–270.

Mata, M.A.S. (2017). Censo de las poblaciones de lince ibérico año 2017. Acedido em Ago. 3, 2018. Disponível em http://www.iberlince.eu/images/docs/3_InformesLIFE/Informe_Censo_2017.pdf

Matoso, A., (1998). Impacto ambiental de antigas minas de sulfuretos localizadas no Alentejo. *Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco*, 13, 45-50.

McCluggage, D. (1991). Heavy Metal Poisoning. *NCS Magazine*. CO, U.S.A: The Bird Hospital.

Miguel, M.P., Souza, M.A., Cunha, P.H.J., Costa, G.L., & Abud, L.J. (2013). Intoxicação crônica por cobre em ovinos: conduta para o diagnóstico conclusivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 65(2), 364–368.

Millán, J., Mateo, R., Taggart, M.A., López-Bao, J.V., Viota, M., Monsalve, L., Jiménez, B. (2008). Levels of heavy metals and metalloids in critically endangered Iberian lynx and other wild carnivores from Southern Spain. *Science of the Total Environment*, 399(1–3), 193–201.

Moreira, J., Grácio, L., Romariz, P., Veloso, P., & Costa, S. (2011). *O Tratamento de Minérios de Cobre da Faixa Piritosa Ibérica*. Porto: Faculdade de Engenharia – Universidade do Porto.

Newman, J., Zillioux, E., Rich, E., Liang, L. & Newman, C. (2004) Historical and other patterns of monomethyl and inorganic mercury in the Florida Panther (*Puma concolor coryi*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 75–80.

Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C. & Chambers, B.J. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment*, 311, 205–219.

Nowell, K. & Jackson, P. (1996). Eurasia. Iberian Lynx. In K. Nowell & P. Jackson (Eds.), *Wild Cats, Status Survey and Conservation Action Plan*. (pp. 106-110). Switzerland: IUCN.

Nriagu, J.O. (1989). A global Assessment of Natural Sources of Atmospheric Trace Metals. *Nature*, 338: 47-49.

Nriagu, J.O., Pacyna, J. (1988). Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soil by Trace Metals. *Nature*, 333: 134-139.

Lecoq, N.J.C.C.A. (2002). *Unidades de Paisagem da Zona Castro Verde – Mértola: Contributos para uma Gestão Ambiental Eficiente*. Dissertação de Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Oliveira, K.D., França, T.N., Nogueira, V.A., & Peixoto, P.V. (2007). Enfermidades associadas à intoxicação. *Pesq. Vet. Bras.*, 27(4), 125–136.

Oowski, S.L., Brewer, L.W., Baker, O.E. & Cobb, G.P. (1995). The decline of mink in Georgia, North Carolina, and South Carolina: the role of contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 418–23.

Padeiro, A.C.G. (2014). *Contaminação de Solos na Península de Fildes (Ilha de King George, Antártida) (Bio)Disponibilidade e Possíveis Estratégias de Remediação*. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Lisboa: Instituto Superior Técnico - Universidade de Lisboa.

Palomares, F., Rodríguez, A., Laffitte, R. & Delibes, M. (1991). The status and distribution of the Iberian lynx *Felis pardina* (Temminck, 1824) in Coto Doñana area, SW Spain. *Biological Conservation*, 57: 159-169.

Palomares, F., Delibes, M., Revilla, E., Calzada, J. & Fedriani, J. M. (2001). Spatial ecology of Iberian lynx and abundance of European rabbits in south-western Spain. *Wildlife Monographs*, 148: 1-36.

Palomares, F., Godoy, J.A., López-Bac, J.V., Rodríguez, A., Roques, S., Casas-Marce, M., Revilla, E., Delibes, M. (2012). Possible extinction vortex for a population of Iberian lynx on the verge of extirpation. *Conserv. Biol.*, 26: 689–697.

Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2), 199–211.

Poppenga, R.H. (2011). Specific Toxicants: Metals and minerals In R.H. Poppenga & S. Gwaltney-Brant. *Small Animal Toxicology Essentials (pp.273-284)*. Wiley-Blackwell by John Wiley and Sons, Inc.

Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., Constable, P. (2007). *A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). London: Elsevier Health Sciences, Saunders Ltd.

Rajeswari, T., & Sailaja, N. (2014). Impact of heavy metals on environmental pollution. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 94(1–3), 247.

Reis, L.L.S.L.S., Pardo, P.E.P., Camargos, A.A.S. & Oba, E. (2010). Mineral element and heavy metal poisoning in animals. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(12), 560–579.

Rogers, T.A. (2010). *Lead exposure in large carnivores in the greater Yellowstone ecosystem*. Master Thesis. Missoula, Montana: Graduate School, University of Montana.

Rodrigues, A.S. (2018). Canine copper-associated hepatitis: a retrospective study of 17 clinical cases. Dissertação de mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Rodríguez, A. & Delibes, M. (1992). Current range and status of the Iberian Lynx (*Felis pardina* Temminck 1824). *Spain. Biol. Conserv.*, 61, 189–196.

Rodríguez, A. & Calzada, J. (2015). Lynx pardinus, The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T12520A50655794. Acedido em Jun, 5, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T12520A50655794.en>

Roelke, M.E., Schultz, D.P., Facemire, C.F. & Sundlof, S.F. (1991). Mercury contamination in the free-ranging endangered Florida panther (*Felis concolor coryi*). *Am. Assoc. Zoo. Vet. Annu. Proc.*, 1991: 277–83.

Rosado, L., Morais, C., Candeias, A., Pinto, A.P., Guimarães, F. & Mirão, J. (2008). Weathering of S. Domingos (Iberian Pyritic Belt) Weathering of S. Domingos (Iberian Pyritic Belt) abandoned mine slags. *Mineralogical Magazine*, 72(1), 489–494.

Rush, S.A., Borga, K., Dietz, R., Born, E.W., Sonne, C., Evans, T., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., Norstrom, R.J. & Fisk, A.T. (2008). Geographic distribution of selected elements in the livers of polar bears from Greenland, Canada and the United States. *Environmental Pollution*, 153: 618-626.

Santana, J.M.P., Soares, A.C.M., Sales, L.H.B., Melo, M.M., & Oliveira, N.J.F. (2014). Intoxicação por cobre em animais domésticos. *Enciclopédia Biosfera*, 10(18), 2054–2070.

Santos, I. (2016). *Conservação ex situ do lince ibérico (lynx pardinus): determinação de valores de referência para análises sanguíneas e análise da morfometria da população do centro nacional de reprodução do lince ibérico*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Sarmiento, P., Cruz, J., Monterroso, P., Tarroso, P., Negrões, N. & Ferreira, C. (2004). The Iberian lynx in Portugal. Status survey and conservation action plan. *ICN internal report*. Acedido em Ago. 5, 2018. Disponível em: www.Lcie.org; www.carnivoreconservation.org

Sarmiento, P., Cruz, J., Monterroso, P., Tarroso, P., Ferreira, C., Negrões, N. & Eira, C. (2009) Status survey of the critically endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* in Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 55: 247-253.

Sarmiento, P., Carrapato, C., Eira, C., & Silva, J. P. (2017). Spatial organization and social relations in a reintroduced population of Endangered Iberian lynx *Lynx pardinus*. *Oryx*, 1–12.

Seixas, T.G. & Kehrig, H.A. (2007). O Selênio no Meio Ambiente. *Oecologia Brasiliensis*, 11(n.2), 264–276.

Sharma, B. & Tyagi, S. (2013). Simplification of Metal Ion Analysis in Fresh Water Samples by Atomic Absorption Spectroscopy for Laboratory Students. *Journal of Laboratory Chemical Education*, 1(3): 54-58.

Simón, M.A., Cadenas, R., Gil-Sánchez, J.M., López-Parra, M., García, J., Fernández, L. & López, G. (2009) Conservation of free-ranging populations of Iberian lynx in Andalusia. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds). *Iberian Lynx Ex Situ Conservation: An Interdisciplinary Approach*. Fundación Biodiversidad, Madrid, Spain.

Simón, M.A., Gil-Sánchez, J.M. & Ruiz, G. (2012). Reverse of the Decline of the Endangered Iberian. *Conservation Biology*, 26(4): 731-6.

Syakalima, M., Choongo, K., Nakazato, Y., Onuma, M., Sugimoto, C., Tsubota, T., Fukushima, H., Yoshida, M., Itagaki, T. & Yasuda, J. (2001). Na Investigation of heavy metal exposure and risks to wildlife in Kafue Flats of Zambia. *Journal of Vet. Med. Sci.*, 63(3): 315-318.

Swarup, D., Naresh, R., Varshney, VP., Balagangatharathilagar. M., Humar, P., Nandi, D. & Patra, R.C. (2007). Changes in plasma hormones profile and liver function in cows naturally exposed to lead and cadmium around different industrial areas. *Res. Vet. Sci.*, 82: 16-21.

Todorovic, T., Vujanovic, D., Dozic, I., & Petkovic-Curcin, A. (2008). Calcium and magnesium content in hard tissues of rats under condition of subchronic lead intoxication. *Magnesium Research*, 21:43-50.

Tokar, E.J., Boyd, W.A., Freedman, J.H. & Waalkes, M.P. (2015). Toxic Agents: Toxic effects of metals. In C.D. Klaassen & J.B.I. Watkins, *Casarett & Doull's essentials of toxicology* (3ªed.).(pp.347-358) New York: McGraw-Hill Medical.

United Nations Environment Programme (UNEP) (2008). Chemicals Branch (DTIE), Review of scientific information on Cadmium.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2007). Framework for Metals Risk Assessment, Washington DC: USEPA.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2018). 2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables, Washington DC: USEPA.

Underwood, E.J. & Suttle, N.F. (2001). Occasionally beneficial elements (boron, chromium, lithium, molybdenum, nickel, silicon, tin, vanadium) In: Underwood, E.J. & N.F. Suttle (Eds.). *The mineral nutrition of livestock* (3rd ed). (pp.513-542). New York, USA: CABI Publishing.

Wachowicz, B., Zbikowska, H.A. & Nowak, P. (2001). Selenium compounds in the environment: their effect on human health. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 6(2a): 375-381.

Waldner, C., Checkley, S., Blakley, B., Pollock, C. & Mitchell, B. (2002). Managing lead exposure and toxicity in cow-calf herds to minimize the potential for food residues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14: 481-486.

World Health Organization (WHO) (2011a). Arsenic in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2011b). Cadmium in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2011c). Lead in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2011d). Selenium in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2003a). Iron in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2003b). Zinc in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2004). Copper in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

World Health Organization (WHO) (2005). Mercury in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: WHO Press.

Zovko, M., & Romic, M. (2011). Soil Contamination by Trace Metals: Geochemical Behaviour as an Element of Risk Assessment. Croatia: Faculty of Agriculture - University of Zagreb In I. A. Dar. (Ed.), *Earth and Environmental Sciences* (pp. 437-456). Croatia: InTech

Anexo I – Protocolo de Colheita e Conservação de amostras de Água para análise de Metais Pesados

Projeto de Trabalho Experimental (MIMV)

I. Objetivo

Estabelecer o protocolo de colheita e armazenamento de amostras de água dos locais identificados como pontos de abeberamento de fauna selvagem, em especial do Lince Ibérico, para posterior deteção e quantificação de metais pesados, através de técnicas de Espectrofotometria de Absorção Atómica.

II. Material e Métodos

1. Material

Para a colheita:

- Recipientes de polipropileno de 500ml, com tampa
- Luvas sem pó
- Etiquetas para identificação de recipientes
- Esferográfica e caneta de acetato
- Pipetas Pasteur descartáveis
- Fita de papel indicador de pH (Merck 0.5-5.0 Acilit® e 5.5-9.0 Neutralit®)
- Acido Nítrico (HNO_3) a 10% e a 65%
- Álcool Etílico a 70%
- Fichas de inventário de amostras
- Caixas de transporte

Para referenciação geográfica e registo de imagem dos locais de colheita:

- Receptor de GPS (telemóvel);

2. Métodos

2.1. Condicionamento prévio dos recipientes de colheita

Para evitar contaminação, é recomendado que os recipientes sejam higienizados previamente à colheita: Enxaguar os recipientes com a solução de ácido nítrico (HNO_3) a 10%, escorrer e fechar.

2.2. Colheita de Amostras

Sempre que o acesso e/ou a profundidade da massa de água o permitir, as amostras serão *compostas*¹, por uma mistura proporcional (50/50, v/v) de água colhida à superfície, junto à margem, e de água retirada a uma distância da margem que permita atingir 50cm de profundidade.

1 Amostra composta - mistura proporcional de várias amostras simples, que podem ser retiradas em locais diferentes ou no mesmo ponto, em tempos diferentes

2 Amostras simples – colheita directa da amostra num ponto representativo de um corpo de água

Caso não seja possível a colheita de uma amostra composta, será colhida uma amostra *simples* à superfície.

2.2.1. Amostras compostas:

- a) Utilizar dois recipientes de colheita (A e B);
- b) Abrir o recipiente A, passar três vezes por água proveniente do local da amostragem;
- c) Encher com água de superfície no ponto da margem selecionado, até aproximadamente 40% da sua capacidade;
- d) Repetir o procedimento descrito em b) para o recipiente B e voltar a fechar;
- e) Segurar o recipiente pela base, submergi-lo a cerca de 50 cm de profundidade, inclinado e com o bocal virado para o lado oposto do corpo do operador;
- f) Retirar a tampa apenas quando o recipiente está submerso, encher o recipiente e voltar a tapá-lo ainda com ele submerso;
- g) Adicionar a água colhida com o recipiente B, à amostra do recipiente A, até perfazer 75% do volume.

2.2.2. Amostras Simples

- h) Utilizar apenas um recipiente;
- i) Efectuar o procedimento descrito em b);
- j) Encher até 75% do volume do recipiente;
- k) Identificar o recipiente com informação apropriada (ver ponto q);
- l) Anotar as informações obtidas durante a colheita na ficha de inventário (Tabela 1) para cada amostra.

Tabela 1 – Ficha de colheita.

Nº/Código da Amostra			
Data		Hora	
Local			
Coordenadas			
Profundidade de colheita			
pH inicial		pH final	
Volume de HNO3 adicionado			
Condições Metereológicas			
Observações			

2.3. Preservação das amostras

Após a colheita, as amostras devem ser refrigeradas entre 1°C e 4°C até à chegada ao laboratório, onde se procede à acidificação das mesmas com HNO₃ até obtenção de um pH<2, para preservação da maioria dos elementos traço e redução das perdas por precipitação, ou, as amostras devem ser acidificadas a um pH<2 imediatamente após a colheita e mantidas à temperatura ambiente, até à sua análise:

- m) Medir pH inicial da amostra com fita de papel indicador de pH apropriado, registar na ficha de inventário de amostras
- n) Com pipeta Pasteur adicionar algumas gotas de ácido nítrico a 65%, fechar o recipiente, homogeneizar, e voltar a medir o pH com fita de papel indicador de pH apropriado.
- o) Repetir o ponto 3.2. tantas vezes quanto as necessárias para obter um valor de pH inferior a 2.
- p) Anotar o volume aproximado utilizado de ácido nítrico para cada amostra
- q) Identificação das amostras (Número da amostra, Nome do local, georreferenciação do local, data de colheita, hora de colheita).

2.4. Transporte de amostras

- r) Acondicionar as amostras na caixa de transporte mantendo-as à temperatura ambiente, durante um período máximo de 6 meses até à sua análise.

Bibliografia

Agência Portuguesa Do Ambiente (2017). *Colheita de amostras de águas balneares*. Lisboa: APA.

Agência Portuguesa Do Ambiente (2017). *Técnicas gerais de conservação das amostras* (2ª Ed.) Lisboa: APA.

Environmental Protection Authority Victoria (2009), *Industrial waste resource guidelines: sampling and analysis of waters, wastewaters, soils and wastes, environment protection (industrial waste resource) regulations*. London: EPA VICTORIA.

Popek, E. P. (2003). *Sampling and analysis of environmental chemical pollutants: a complete guide*. Academic Press.

U.S. Environmental Protection Agency (1994). *Method 200.7, revision 4.4: determination of metals and trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma – mass spectrometry*. Ohio: USEPA.

U.S. Environmental Protection Agency (1994). *Method 200.8, revision 5.4: determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma – mass spectrometry*. Ohio: USEPA.

U.S. Environmental Protection Agency (1996). *Method 1669: sampling ambient water for trace metals at epa water quality criteria level, office of water, engineering and analysis division*. Washington D.C.: USEPA.

U.S. Geological Survey (2006). *Preparations for water sampling, national field manual for the collection of water- quality data*. USGS. Acedido em Dez. 3, 2017. Disponível em: https://water.usgs.gov/owq/FieldManual/compiled/NFM_complete.pdf.