



# **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM VERTEBRADOS AQUÁTICOS FACE À EXPOSIÇÃO AGUDA DE COBRE NO MEIO**

**Evanildo Tavares Monteiro**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Biotecnologia*

Orientadora: Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes

Co-orientador: Professor Doutor Amílcar Teiga Teixeira

**Bragança**

**2012**

*A minha mãe e aos meus irmãos,  
a quem devo tudo aquilo que sou*

## **AGRADECIMENTOS**

Desde o início da realização desta tese de mestrado contei sempre com o apoio e colaboração de um conjunto de pessoas, pelo que a todos, manifesto o meu agradecimento por todo o incentivo durante realização e conclusão deste trabalho. Para além disso, gostaria de destacar aqueles aos quais quero deixar o meu mais profundo agradecimento.

Em primeiro lugar gostaria de deixar o meu sincero agradecimento e reconhecimento aos meus orientadores, à Doutora Conceição Fernandes e ao Doutor Amílcar Teixeira, pela orientação, apoio, pelos conhecimentos e disponibilidade prestada durante toda a fase da concretização da dissertação final. Por toda a atenção, paciência, dedicação inesgotável de forma incondicional, e pela confiança da atribuição deste trabalho científico, acima de tudo por toda a amizade demonstrada.

Ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) por todos os meios disponibilizados ao longo de toda a minha formação académica. Em particular à Escola Superior Agrária de Bragança do IPB (ESAB), pela oportunidade e o apoio concedido durante o decorrer da minha Licenciatura e Mestrado na mesma.

Ao laboratório de Aquacultura da Escola Superior Agrária de Bragança do IPB, pelos materiais, equipamentos e espaços disponibilizados.

Um especial reconhecimento e agradecimento à Doutora Ana Geraldês por todo o auxílio, ajuda prestada ao longo da realização do trabalho laboratorial e escrito. Pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade, atenção e amizade demonstrada.

Ao Engenheiro David Cabral, e a Dona Odete Diego de LAQ da Escola Superior Agrária de Bragança pela ajuda e colaboração, pela disponibilidade e toda a atenção concedida durante a determinação de análises químicas, essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao Doutor Luís Felipe Nunes pelo valioso apoio, disponibilidade e conhecimento transmitido quanto ao tratamento estatístico dos dados resultantes desta investigação

Aos elementos do departamento do laboratório de agro-indústria, por proporcionarem momentos inesquecíveis, durante todo trabalho laboratorial, pela amizade e atenção, especialmente à Dona Céu Fidalgo e à Engenheira Teresa Delgado.

A todos os meus amigos e pessoas fantásticas que conheci em Bragança, deixo um enorme e especial agradecimento, especialmente à Dona Maria Adelaide Oliveira, à Sandra Cardoso, ao Eric Carvalho, à Maria Inês Dias, à Liliana Nogueira, ao Rodrigo Costa, à Arminda Carvalho, à Andreia Amaro, ao Marco Rafael, Doutor António Inácio, ao Doutor Luís Dias, à Doutora Ana Maria Carvalho, ao Doutor Luís Costa, ao Doutor Sérgio Ferreira, à Doutora Anabela Martins, à Professora Doutora Maria João Sousa, à Filipa Reis, ao Ruben Andrés Ortega, ao André Amorim, à Tatiana Vaz, ao Mauro Teixeira, ao Leandro Camarneiro, ao Diogo Taveira, à Georgina Tolentino, ao Telmo Correia, ao Pedro Rego, ao Nuno Carvalho, à Cláudia Sieiro, e ao Edvaldo Rodrigues por todo o apoio em todas as circunstâncias, momentos menos fáceis, pela confiança, amizade incondicional e pela recordação, saudades dos bons momentos.

Aos meus amigos e colegas de turma, quero deixar um grande agradecimento, à Ana Raquel Leal, à Eliana Fernandes, ao José Pinela, à Rosa Cristina Sousa, à Sara Pinto, por todos os momentos, pela atenção, dedicação e companheirismo. Com certeza que foram importantes durante toda a minha vida académica.

A todos os meus amigos e colegas da Associação de Estudantes da Escola Superior Agrária de Bragança, Associação Académica de Estudantes do IPB e da Real Tuna Universitária de Bragança, um forte obrigado pela compreensão, pelo apoio e por todos os momentos fantásticos que me proporcionaram. Sem dúvida que são pessoas fantásticas e sempre com um bom sentido de organização e orientação. Posso dizer que tiveram um papel determinante em todos estes anos que estive em Bragança, particularmente aos amigos Bruno Miranda, José Mário, Sara Sampaio, Márcio Carochó, Bruno Serra, Luís Salsa, Bruno Teixeira, Nelson Louçano, e ao Ricardo Fão.

Quero agradecer e deixar um grande obrigado a todos os funcionários da Escola Superior Agrária de Bragança, e do IPB.

Queria deixar um grande agradecimento aos meus familiares, em especial aos meus irmãos e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho, um grande e sincero obrigado.

## RESUMO

Em dezembro de 2009 ocorreu o colapso das escombreyras das minas do Portelo, tendo sido incorporado uma grande quantidade de sedimentos na rede hídrica e detectadas concentrações elevadas de metais pesados, em especial de cobre (Cu). No presente estudo foi feita a avaliação de biomarcadores em vertebrados aquáticos face à exposição aguda de cobre no meio aquático, tendo sido seleccionados indicadores bioquímicos (*e.g.* concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> plasmático). Escolheu-se uma espécie piscícola endémica da Península Ibérica, o barbo comum (*Luciobarbus bocagei*).

Com base numa população de 53 peixes, foram realizados ensaios de toxicidade aguda em sistema estático, com diferentes concentrações de cobre (*i.e.* 0,06 ppm, 0,11 ppm, 0 20ppm e 0,48 ppm), considerando ainda o respectivo controlo.

Segundo os resultados obtidos não foram encontradas diferenças na condição física (índice *K*) dos peixes, como resposta à presença de Cu. No entanto, foram registadas elevadas mortalidades nos ensaios com concentrações superiores de Cu.

Os resultados mostraram ainda que o valor médio do K<sup>+</sup> plasmático dos barbos controlo foi de 6,53±2,01 mM/L, sendo um valor significativamente inferior, quando comparado com os barbos expostos ao cobre. No que respeita à concentração plasmática de Na<sup>+</sup>, verificou-se que o valor médio deste electrólito, nos peixes controlo, foi de 221±37 mM/L, significativamente superior, quando comparado com os barbos expostos ao cobre.

O Na<sup>+</sup> plasmático diminui significativamente com o aumento da concentração de exposição de cobre, sugerindo que este metal pesado compete com Na<sup>+</sup>, a nível da ATP-ases, levando à sua diminuição. O aumento do K<sup>+</sup> plasmático observado neste estudo pode ser uma medida compensatória, de modo a manter o equilíbrio iónico. Este aumento da concentração de K<sup>+</sup> plasmático e a diminuição da concentração de Na<sup>+</sup> plasmático, nos peixes expostos ao Cu, produz alterações importantes na regulação iónica e provavelmente também a nível dos parâmetros hematológicos.

Os biomarcadores utilizados neste estudo (electrólitos plasmáticos) mostraram ser suficientemente sensíveis, dado terem sido detectadas alterações que traduzem uma relação causa-efeito da exposição dos barbos ao cobre.

Os resultados dos ensaios desenvolvidos em condições controladas (*i.e.* em laboratório) poderão ser extrapolados, já que é de crer que possam ter ocorrido fenómenos de toxicidade no ecossistema aquático que justificaram o desaparecimento e/ou diminuição de espécies aquícolas outrora presentes na rede hídrica. Contudo, é de

esperar que com a gradual diminuição do teor de metais na água, seja restabelecido o equilíbrio ecológico. Nesse contexto, é essencial promover medidas que inviabilizem a entrada de sedimentos e água proveniente das minas, de modo a eliminar fontes de poluição química e física.

**Palavras-chave:** metais pesados, toxicidade, biomarcadores, electrólitos, *Luciobarbus bocagei*

**ABSTRACT**

In december 2009, heaps of the Portelo mine collapsed and incorporated a high quantity of heavy metals in the hydric system, namely copper (Cu). In the present study, biomarkers were evaluated in aquatic vertebrates, under acute copper exposure. Biochemical indicators ( $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  plasmatic concentrations), and Iberian fish specie (*Luciobarbus bocagei*) were chosen.

Based on a population of 53 barbels acute toxicity tests were conducted on static system, with different copper concentrations (0.06 ppm; 0.11 ppm; 0.20 ppm and 0.48 ppm, and a control group with no copper exposure).

According to our results, no significant differences were found in condition factor (*K* index) between fish control and fish exposed to Cu. However, high mortality rates were observed in assays under higher Cu doses. Results also showed that average value of plasmatic  $\text{K}^+$  of control barbels was  $6.53 \pm 2.01$  mM/L, a significantly lower value when compared to barbels exposed to copper. Regarding plasmatic concentration of  $\text{Na}^+$ , average value in control fish was  $221 \pm 37.06$  mM/L, a value significantly higher than barbels exposed to copper.

The  $\text{Na}^+$  levels decreases significantly with increasing exposition copper concentration, suggesting that this heavy metal compete with  $\text{Na}^+$ , at ATP-ases level, leading to their decrease. The increase of plasmatic  $\text{K}^+$  observed in this study could arise from a compensatory measure to maintain ionic equilibrium. This increase of plasmatic concentration of  $\text{K}^+$  and decrease of plasmatic concentration of  $\text{Na}^+$ , in the fish exposed to Cu, produces important changes in ionic regulation and probably also to at hematological parameters level.

The biomarkers used in this study (plasmatic electrolytes) seemed to be sensitive enough, since biological changes observed correlate well a cause-effect arising from barbel exposition to Cu. Results of assays developed in a controlled environment (laboratory), could be extrapolated, as it is believed that in aquatic ecosystem, might have occurred toxicity effects that justified the disappearance and/or reduction of fish species, once present in this streams. However, it is expectable that with a gradual reduction of metals content in water, the ecological balance should be achieved. In this context, it is essential that the sediments and water input from mine are avoided, in order to eliminate sources of chemical and physical pollution.

**Key-words:** heavy metals, toxicity, biomarkers, electrolytes, *Luciobarbus bocagei*.

**ÍNDICE GERAL**

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE GERAL .....	vi
INDICE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Metais pesados: cobre .....	3
2.2. Biomarcadores .....	5
2.3. Brânquias e o seu papel na regulação osmótica.....	6
2.4. Organismo: <i>Luciobarbus bocagei</i> (Steindachner, 1864) .....	8
2.5. Minas do Portelo .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1. Amostragem.....	13
3.2. Condições dos Ensaios.....	14
3.2.1. Aclimação dos peixes .....	15
3.2.2. Ensaios de Exposição Aguda ao Cobre.....	16
3.3. Recolha de Amostras Biológicas .....	19
3.4. Determinações Analíticas .....	19
3.5. Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
4.1. Aclimação .....	22
4.2. Ensaios de exposição aguda ao Cu .....	23

4.2.1. Qualidade da água .....	23
4.2.2. Parâmetros morfométricos .....	25
4.2.3. Electrólitos .....	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

**INDICE FIGURAS**

<b>Figura 2. 1</b> - Brânquias (a, b) - a: Micrografia electrónica de um arco branquial de peixe-sapo do Golfo ( <i>Opsanus beta</i> ), com 15 filamentos e várias lamelas. b: Diagrama de um filamento e seis lamelas, indicando a direcção do fluxo da água entre as lamelas e o fluxo do sangue dentro dos filamentos e das lamelas, Adaptado de <i>Evans et al. (1999)</i> .....	7
<b>Figura 2. 2</b> - Fotografia do barbo ( <i>Luciobarbus bocagei</i> ) ( <a href="http://www.fishbase.org">www.fishbase.org</a> ).....	9
<b>Figura 2. 3</b> - Localização geográfica da Mina de Portelo.....	11
<b>Figura 3. 1</b> - Bacia Hidrográfica do Rio Douro – Rio Sabor (Fonte: INAG).....	14
<b>Figura 3. 2</b> - Tanques usados na aclimação dos peixes. ....	15
<b>Figura 3. 3</b> - Exemplo dos tanques usados nos ensaios de exposição ao cobre. ....	16
<b>Figura 3. 4</b> - Esquema representativo da metodologia usada com os ensaios.....	17
<b>Figura 4. 1</b> - A: Curva de calibração para cobre (Linearidade $R^2=0,99$ ; Equação da recta: $y= 0,2119x + 0,0021$ ); B: Curva de calibração para cobre (Linearidade $R^2=0,99$ ; Equação da recta: $y= 0,2196x + 0,004$ ). ....	24
<b>Figura 4. 2</b> - Distribuição do comprimento médio dos barbos por tanque. ....	26
<b>Figura 4. 3</b> - Distribuição do índice de robustez ( <i>K</i> ) médio dos barbos por tanque.....	28
<b>Figura 4. 4</b> - A: Curva de calibração para $K^+$ plasmático (Linearidade $R^2=0,98$ ; Equação da recta: $y=1,179x + 42,61$ ); B: Curva de calibração para $Na^+$ plasmático (Linearidade $R^2=0,99$ ; Equação da recta: $y=2,88x + 44,98$ ). ....	31
<b>Figura 4. 5</b> - Distribuição média do $K^+$ plasmático por tanque. ....	33
<b>Figura 4. 6</b> - Distribuição média do $Na^+$ plasmático por tanque.....	34
<b>Figura 4. 7</b> - Concentração média e DP do $K^+$ plasmático dos barbos por tanque de ensaio.....	36
<b>Figura 4. 8</b> - Concentração média e DP do $Na^+$ plasmático dos barbos por tanque de ensaio.....	37
<b>Figura 4. 9</b> - Relação da variação da concentração $Na^+/K^+$ plasmático (N = 42). ....	38

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 3. 1</b> - Condições dos tanques, usados no ensaio de toxicidade ao Cu. ....	18
<b>Tabela 4. 1</b> - Parâmetros da qualidade da água de aclimação.....	23
<b>Tabela 4. 2</b> - Concentração do Cu nas águas dos tanques de ensaio. ....	23
<b>Tabela 4. 3</b> - Parâmetros da qualidade da água nos tanques de ensaio (M±DP). ....	25
<b>Tabela 4. 4</b> - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque controlo ([Cu] = 0 ppm). .....	26
<b>Tabela 4. 5</b> - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 1 ([Cu] = 0,06 ppm). ...	27
<b>Tabela 4. 6</b> - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 2 ([Cu] = 0,11 ppm) ...	27
<b>Tabela 4. 7</b> - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 3 ([Cu] = 0,20 ppm). ...	29
<b>Tabela 4. 8</b> - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 4 ([Cu] = 0,48 ppm). ...	30
<b>Tabela 4. 9</b> - Diluições efectuadas ao plasma dos barbos utilizados nos ensaios de exposição ao cobre. ....	31
<b>Tabela 4. 10</b> - Concentração de K <sup>+</sup> plasmático dos peixes nos diferentes tanques (mM/L). ....	32
<b>Tabela 4. 11</b> - Concentração de Na <sup>+</sup> plasmático dos peixes nos diferentes tanques (mM/L). ....	33

## **1. INTRODUÇÃO**

Os ecossistemas naturais são extremamente ricos e diversificados, sendo constituídos por inúmeras componentes bióticas e abióticas. As actividades quotidianas da população humana resultam, muitas vezes, na contaminação dos ecossistemas com compostos tóxicos de origem natural ou antropogénica que afectam o equilíbrio ambiental e consequentemente a respectiva biodiversidade e em particular a qualidade do ecossistema aquático (Fontainhas-Fernandes, 2005). A variedade de substâncias xenobióticas, usualmente referidas como poluentes e que podem afectar os seres vivos é muito vasta, merecendo especial destaque os metais pesados. Apesar das concentrações de metais pesados nos solos e sedimentos não poluídos serem geralmente baixas, muitas áreas próximas de complexos urbanos e industriais, incluindo as de extração de minério, apresentam concentrações elevadas destes elementos. Este aumento de metais ocorre devido a descargas de efluentes, à deposição em aterros e à emissão atmosférica com a consequente deposição, contribuem desta forma para o impacto negativo no ambiente. O efeito particularmente negativo dos metais pesados resulta da elevada persistência destes compostos no ambiente e da susceptibilidade de acumulação nos seres vivos, podendo atingir níveis tóxicos (Fernandes et al., 2008a).

O ecossistema aquático é o que apresenta maior risco de contaminação, já que os metais podem ser incorporados por fenómenos de lixiviação, via efluentes ou via erosão, com a consequente distribuição na água, nos sólidos em suspensão, nos sedimentos e *biota* (Fernandes et al., 2008). Contrariamente a outros poluentes, os metais embora passíveis de uma certa regulação pelo organismo, não são irreversivelmente transformados ou metabolizados (Drexler et al., 2003, Fernandes et al., 2007b). O aumento da sua presença no meio aquático e a sua acção potencialmente tóxica, conduz a que os metais como poluentes sejam encarados com preocupação.

Os peixes são particularmente sensíveis à contaminação, o que lhes confere uma grande importância na monitorização da qualidade da água (Fernandes, et. al., 2008a; Vinodhini & Narayanan, 2009). Nesse contexto, os peixes são frequentemente utilizados para avaliar a qualidade do ecossistema aquático, como biomarcadores de poluição ambiental, através de estudos realizados ao nível das mudanças fisiológicas (Saiki, 1990; Saiki et al., 1993; Salazar-Lugo et al., 2011). São conhecidas alterações morfológicas e bioquímicas nos peixes, que podem mesmo conduzir à morte, dada a exposição aguda associada à presença de metais. A título de exemplo, o mecanismo da toxicidade aguda do Cu nos peixes é bem conhecido e envolve a acção directa em órgãos alvo (Handy, 2003).

Em Janeiro de 2010 resíduos da mina do Portelo, localizada no Parque Natural de Montesinho, foram derramados na ribeira do Portelo, levando a uma alteração do ecossistema aquático. Dos diversos metais pesados dispersos no curso de água, o Cu foi dos que apresentou concentração mais elevada. Nesse contexto, o objectivo da presente dissertação foi averiguar qual o impacto do Cu em peixes, avaliando para esse efeito as alterações ocorridas a nível de alguns electrólitos plasmáticos.

A dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos. Para além da introdução, na qual são definidos os objectivos, no capítulo 2, dedicado à revisão bibliográfica, é abordada a toxicidade do Cu, são tecidas algumas considerações sobre o uso de biomarcadores, é caracterizada a espécie ictiológica usada e feita uma breve caracterização das minas do Portelo. No capítulo 3, encontram-se referidos os materiais e métodos utilizados nos ensaios de toxicidade, nas colheitas de amostras e nas determinações dos teores em Cu e em electrólitos plasmáticos, e no capítulo 4 os resultados obtidos e consequente discussão dos mesmos. No capítulo 5, são sintetizadas as principais considerações alcançadas neste estudo e finalmente o capítulo 6 é dedicado à listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. **Metais pesados: cobre**

Os sistemas aquáticos naturais podem ser contaminados extensivamente com metais pesados libertados sob a forma doméstica, industrial e outras actividades antropogénicas, com consequente distribuição nas fases que integram, normalmente a água, os sólidos em suspensão, os sedimentos e o *biota* (Fernandes et. al., 2008a). Esses elementos podem apresentar-se sob a forma iónica, complexada e em partículas e dessa forma ao contaminarem o ecossistema aquático podem sofrer transformações químicas que os tornam ainda mais nocivos para organismos aquáticos. Além da consequente toxicidade, dependente da concentração e do tempo de exposição, os metais pesados são poluentes que apresentam ao mesmo tempo persistência e capacidade de bioacumulação nos seres vivos (Fernandes et al., 2007b).

O cobre é um importante componente para os mecanismos biológicos, relativamente às funções fisiológicas, propriedades e integridades estruturais, pois desempenha funções de cofactor nas reações catalíticas das enzimas de desenvolvimento, crescimento e manutenção em muitos organismos e igualmente no homem (Nzengue et al., 2011). Em particular para os organismos aquático, como peixe, o cobre é considerado um micronutriente essencial, obtido directamente da água e através da alimentação (Bielmyer et al., 2005). Tal como outros metais pesados, o Cu apresenta elevada persistência no ambiente e tem ainda a capacidade de bioacumulação em diversos órgãos dos peixes (Fernandes et al., 2008a; Ezeonyejiaku et al., 2011). A bioacumulação dos metais essenciais, como o Cu, pode ser regulada pelo peixe, num intervalo de concentrações, todavia pode apresentar efeitos tóxicos quando o equilíbrio homeostático é afectado e as concentrações nos tecidos são aumentadas (Fernandes, 2007). De um modo geral, a exposição e bioacumulação dos metais pesados está relacionada com os parâmetros da água, como por exemplo a temperatura que influencia fortemente o grau de danos teciduais ou morte (Karadede & Unlü, 2000; Sanchez et al., 2005). Os factores biológicos também podem influenciar a bioacumulação dos metais, entre os quais se destacam a espécie, comportamento, fisiologia, morfologia, idade, tecido alvo e a capacidade reguladora do indivíduo (Fernandes, 2007).

As principais vias de entrada de metais nos peixes são a ingestão e a absorção, em particular através das brânquias, atendendo a que pela derme o contributo é menor (Berntssen et al., 2001; Drexler et al., 2003; Alvarado et al., 2006). A concentração de metais nos tecidos, embora um indicador da exposição ao contaminante, não apresenta necessariamente uma relação directa com a concentração no meio, dado que a biodisponibilidade dos metais depende de diversos factores abióticos e bióticos. Por outro lado, embora a bioacumulação represente o balanço entre a entrada do contaminante e a sua depuração pelo organismo, envolve vários processos como a absorção, metabolismo, redistribuição, compartimentação em tecidos específicos e excreção que vão influenciar a acumulação e a toxicidade (Fernandes, 2007). Além disso, a exposição aguda aos metais, como o Cu, pode resultar em alterações metabólicas e inclusive a morte do organismo, sem que ocorra bioacumulação, de forma proporcional. Do exposto resulta que a biodisponibilidade do Cu e a sua concentração em órgão ou tecidos alvos e a sua toxicidade intrínseca podem induzem alguns efeitos biológicos e bioquímicos nos organismos aquáticos.

## 2.2. Biomarcadores

Inicialmente os biomarcadores eram denominados índices de stress e actualmente são consideradas biomarcadores, tanto no domínio da ecotoxicologia, como também na toxicologia humana (Livingstone, 1993). Embora o conceito de biomarcador tenha evoluído, actualmente são considerados como sendo alterações traduzidas por uma resposta biológica, desde os níveis molecular, celular e fisiológico até comportamental, as quais podem estar relacionadas com a exposição de produtos químicos ou radiações libertadas no ambiente (NRC, 1989; Adams, 1990; Depledge et al., 1993; Peakall, 1994).

O termo biomarcador foi definido pela “National Academy of Sciences” dos USA como sendo “uma variação induzida por xenobióticos em componentes celulares ou bioquímicos ou processos, estruturas, ou funções que são medidos num sistema biológico ou amostra” O objectivo do uso dos biomarcadores é o de relacionar a presença de substâncias tóxicas no meio com os efeitos no organismo, sendo que geralmente estes efeitos podem depender da toxicidade da substância, concentração e do grau de exposição. Apesar do uso de biomarcadores ser amplamente reconhecido, existem algumas limitações à sua aplicabilidade que abarcam a complexidade e custo da metodologia, bem como os vários graus de especificidade (Fernandes et. al, 2008a).

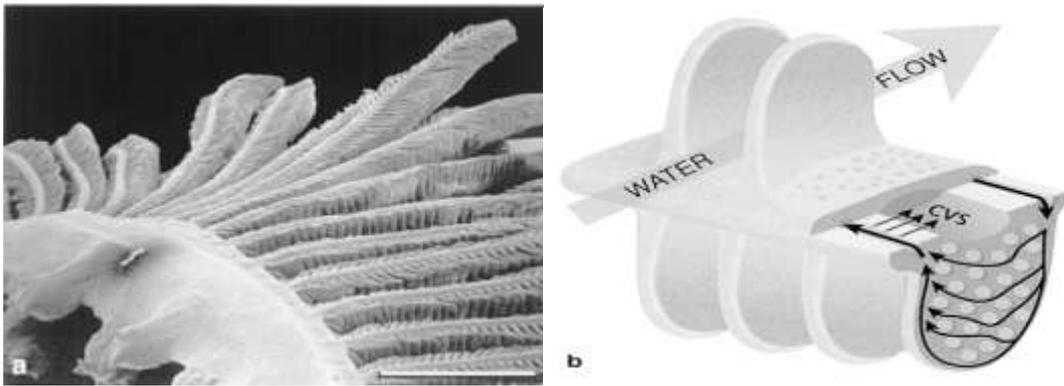
Basicamente existem três tipos de biomarcadores, nomeadamente, biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade (NCR, 1989). Biomarcadores de exposição indica que as respostas dos biomarcadores podem ser determinadas como efeito a nível biológico e bioquímico após a exposição a certos tóxicos, o que as torna viável como indicadores de exposição e de efeito. Biomarcadores de efeito, são utilizados para documentar alterações pré-clínicas e também os efeitos adversas devido a exposição ou absorção de químicos, por exemplo, as alterações bioquímicas e fisiológicas. Biomarcadores de susceptibilidade auxiliam no conhecimento das variações, no grau de resposta à exposição de tóxicos, observados entre diferentes organismos (Van der Oost et al., 2003).

Geralmente, na avaliação da exposição e efeitos tóxicos dos poluentes no ecossistema aquático, existe um conjunto de biomarcadores em peixes que podem ser utilizados e que representam fontes de informação de elevada importância nos programas de monitorização ambiental. Destes, a diminuição de sódio no plasma tem sido amplamente usada como um indicador de stress ambiental, devido à inibição da

actividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial (Mazon et al., 2002). A presença de metais no meio aquático, pode induzir alterações estruturais na brânquia e afectar a capacidade respiratória e a regulação iónica e osmótica dos peixes (Wendelaar Bonga & Lock, 1992; Martinez et al. 2004; Fernandes et al., 2007a). Nos peixes de água doce em geral, concentrações moderadas de metais influenciam a regulação iónica, enquanto concentrações elevadas podem alterar a capacidade respiratória, devido a alterações estruturais, podendo mesmo conduzir à morte (Playle, 1998). A título de exemplo, refira-se que o Cu pode induzir a inibição da captação activa de iões, através da inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Li et al., 1998) e aumentar a permeabilidade do epitélio, conduzindo a um acréscimo do fluxo iónico (Laurén & McDonald, 1985).

### **2.3. Brânquias e o seu papel na regulação osmótica**

As brânquias, pela sua localização e ampla superfície, são sensíveis à presença de vários contaminantes. Além disso, representam órgãos de grande importância a nível das funções metabólicas dos peixes, com capacidade de desempenhar funções essenciais como a troca gasosa, a osmorregulação, a excreção de poluente e compostos azotados e participa na acção do equilíbrio ácido-base (Evans et al., 1999; Wood, 1991). Além de permanecerem em contacto de forma constante com a água (meio externo), a fim de efectuar a troca gasosa (Biagini et al., 2009), elas representam ainda uma importante barreira aos poluentes, entre o meio externo e o meio interno, sendo um alvo primário dos poluentes (Mallatt 1985; Perry & Laurent, 1993). Nos teleósteos, cada arco branquial é constituído por múltiplos filamentos que são subdivididos em lamelas que representam os locais da troca gasosa (Figura 2.1a). Quanto ao fluxo de água, esta ocorre em contra-corrente em relação ao fluxo do sangue que passa pela lamela (Figura 2.1b), maximizando a quantidade de gás, o gradiente iónico e osmótico (Evans et al., 1999).



**Figura 2. 1** - Brânquias (a, b) - a: Micrografia electrónica de um arco branquial de peixe-sapo do Golfo (*Opsanus beta*), com 15 filamentos e várias lamelas. b: Diagrama de um filamento e seis lamelas, indicando a direcção do fluxo da água entre as lamelas e o fluxo do sangue dentro dos filamentos e das lamelas, Adaptado de *Evans et al. (1999)*.

A osmorregulação representa um processo homeostático de manutenção do equilíbrio de sais e água no interior do ser vivo, um mecanismo importante para manter a pressão osmótica do meio interno estável. A osmorregulação em peixes é realizada pelas estruturas como o epitélio gastrointestinal, rins, e brânquias, esta última considerada como o principal local (Evans et al., 1999). Esse processo varia conforme o habitat em que os animais aquático se encontram, ou seja, depende do meio aquático ser água salgada, ou meio aquático de água doce. Em água doce o meio interno do peixe é hipertónico em relação ao meio aquático e a osmorregulação visa opor-se à passagem de água, pelo processo de osmose, para o interior do organismo e ainda à possível perda de sais por processo de difusão. Quanto ao ecossistema marinho, o meio interno do peixe é hipotónico quando comparado com a água do mar, dessa forma o mecanismo da osmorregulação deve opor-se à potencial perda de água por osmose e ocorre a secreção de sais, por um lado através das brânquias por transporte activo e por outro lado através da urina.

Em particular, para as espécies de água doce, a toxicidade aguda de Cu pode envolver a inibição da captação activa dos electrólitos sódio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) pelas brânquias (Mazon et al., 2002, Grosell et al., 2002). Como anteriormente referido, brânquias são extremamente sensíveis às alterações físicas e químicas do ecossistema aquático, pelo que os efeitos de metais pesados sobre a regulação iónica branquial, regulação dos electrólitos plasmáticos, têm sido estudados (Mazon et al., 2002, Grosell et al., 2003, Fernandes et al., 2007c).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases representam um complexo enzimático, proteína membranar, envolvido na regulação iónica branquial (Garcia-Santos et al., 2006). É frequentemente encontrado em abundância nalgumas células especiais epiteliais frequentemente designada como célula de cloreto (CC) ou células mitocondriais (MRC), estas células geralmente compõe menos de 10 % do epitélio (Wilson & Laurent, 2002). Estudos indicam a existência de uma forte competição antagónica entre o Cu e  $\text{Na}^+$ , uma vez que estes partilham o mesmo canal de entrada em células epiteliais, (Grosell & Wood, 2002). Por outro lado, o Cu para além da inibição da actividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, afecta também a permeabilidade do epitélio branquial, proporcionando de igual modo um aumento do fluxo iónico (Laurén & McDonald, 1985).

A diminuição de sódio no plasma tem sido amplamente usada como um indicador de stress ambiental, devido à inibição da actividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial (Mazon et al. 2002). Diversos estudos demonstraram existir uma diminuição do teor plasmático em sódio, como resposta à toxicidade aguda causada por metais, em peixes de água doce (Mazon et al., 2002; Martinez et al. 2004; Taylor et al., 2004; Monteiro et al., 2005). De igual modo, as concentrações plasmáticas de cloro, potássio e cálcio também têm sido utilizadas como indicadores da função osmótica.

#### **2.4. Organismo: *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864)**

O *Luciobarbus bocagei* é um teleóstéo de água doce, encontrado com muita abundância em muitos rios e ribeiros da Península Ibérica. Este ciprinídeo é endémico da Península Ibérica e ocupa quase a totalidade das bacias hidrográficas de Portugal continental, com exceção das bacias dos rios Guadiana, Mira e das ribeiras do Algarve (Pinheiro et al., 2000). Esta espécie apresenta grande adaptabilidade, ocupando um largo espectro de habitat, de caracter lótico, e prefere locais com correntes fracas e evita águas com baixas temperaturas.



**Figura 2. 2** - Fotografia do barbo (*Luciobarbus bocagei*) (WWW.fishbase.org).

O barbo representa um género de peixe muito estudado, quer a nível da sua morfologia, quer a nível da sua diversidade haplotípica e relações filogenética entre as suas linhagens, pelo que as espécies diplóide e hexaplóide habitam a África e Ásia, enquanto as tetraplóides encontram-se geograficamente distribuída pelo continente africano, Ásia ocidental e a Europa. O subgénero endémico da Península Ibérica de *Luciobarbus*, inclui o *Barbus comizo*, *Luciobarbus bocagei*, *Barbus microcephalus*, *Barbus sclateri*, *Barbus guiraonis* e *Barbus graellsii*, (Doadrio et al., 2002).

Neste trabalho foi usada a espécie *Luciobarbus bocagei*.

A época de reprodução decorre de Maio a Julho, nessa época efectua migrações potamódromas para os sítios propícios para a desova, normalmente em zonas pouco profundas e com substratos de cascalho ou gravilha, aonde a água disponibiliza uma boa taxa de oxigenação (Pinheiro et al., 2000). Possuem como habitat, o sector médio dos rios, de correntes moderadas e água não muito fria, e normalmente refugiam-se nas margens juntos as pedras e vegetação.

Quanto à alimentação pode ser classificada como bentónica e omnívora, alimentam-se a partir de uma grande variedade de alimentos como animais vivos ou mortos de pequenos portes, alguns detritos, como exemplo moluscos, crustáceos, insetos e alguns pequenos peixes (Doandrio et al., 2002).

Esta espécie apresenta um tamanho médio, tem o perfil da cabeça ligeiramente convexo, com boca inferior com dois pares de barbilhos. Os barbilhos posteriores atingem a linha média do olho. A barbatana dorsal apresenta o raio ossificado a 2/3 da altura da dorsal sendo o perfil posterior da barbatana quase linear e obliquo relativamente ao perfil dorsal do corpo. O lábio superior é grande e espesso estando o

lábio inferior ligeiramente retraído. A região dorsal é castanho-esverdeado, região ventral branca ou avermelhada. Os juvenis apresentam manchas escuras na zona dorsal que desaparecem nos adultos. Durante a época da reprodução os machos têm tubérculos nupciais na cabeça (pontuações esbranquiçadas na região cefálica) e as fêmeas cavam o sulco onde depositam os ovos (Ribeiro et al., 2007). Os indivíduos deste *taxon* podem atingir 100 cm, alcançando usualmente as fêmeas maiores dimensões e longevidade que os machos (Pinheiro, s/ data).

## 2.5. Minas do Portelo

Os despojos das minas são responsáveis pela degradação de muitos rios em diferentes regiões do mundo. Entre os muitos impactos ambientais referenciados por diversos estudos merecem destaque as alterações físico-químicas da água, nomeadamente as relacionadas com a biodisponibilidade de metais pesados. Em Portugal existem várias minas antigas abandonadas, algumas encontram-se muito degradadas, contendo um grande volume de resíduos velhos de mineração com significativo impacto ambiental, quer a escala local ou regional (Santos Oliveira et al., 2002; Cabral-Pinto & Silva, 2005). As minas do Portelo, encontram-se localizadas no Parque Natural de Montesinho, próximo da fronteira com Espanha (Figura 2.3). Estas minas foram desactivadas há mais de 20 anos, encontrando-se em fase de recuperação desde Março de 2007, quando foi estabelecido um protocolo entre a Câmara Municipal de Bragança e a Empresa de Desenvolvimento Mineiro S.A. Segundo o SIORMINP, Sistema de Informação de Ocorrências e Recursos Minerais Portugueses. O recurso mineral viável explorado nestas minas foi o Estanho (Nogueira, 2011).

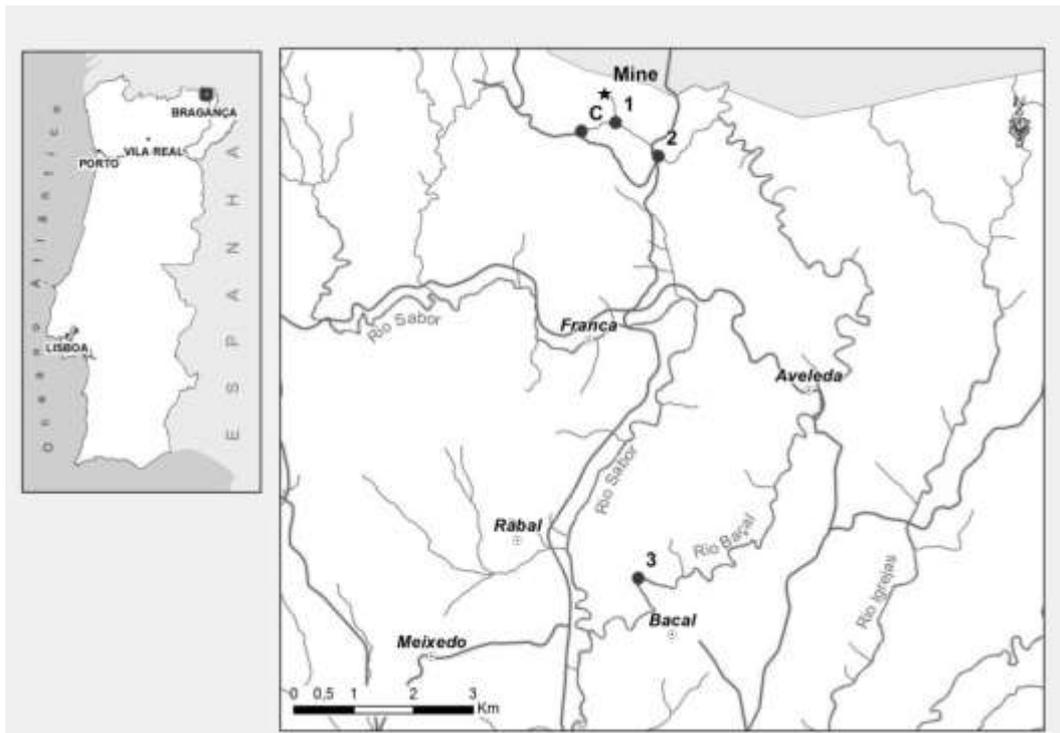


Figura 2. 3 - Localização geográfica da Mina de Portelo.

No final do ano de 2009 ocorreu o colapso de escombrelas existentes na área mineira do Portelo. Como consequência das intensas chuvas, muito milhões de metros cúbicos de resíduos e de água ácida foram derramados na ribeira do Portelo. Este curso de água de cabeceira flui através de substratos graníticos e xísticos por cerca de 20 km, sendo um afluente do rio Sabor que desemboca no rio Douro. Os resíduos cobriram o leito com uma camada de partículas finas de grãos, atingindo 50 cm de áreas mais próximas à mina. Ambas as áreas agrícolas e ribeirinhas foram também afectadas pelo derramamento dos resíduos da mina (Nogueira, 2011).

Face a esta situação, foram empreendidos vários estudos para avaliar alguns impactos ambientais ocorridos no sistema aquático e ribeirinho. A avaliação da contaminação em metais pesados no curso de água mostrou que o Cu foi dos que apresentou concentração mais elevada. Por outro lado, verificou-se uma diminuição acentuada das espécies ictiológicas típicas deste curso de água, como o barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*).

Nesse contexto e como referido, o objectivo deste trabalho foi averiguar qual o impacto da toxicidade aguda do Cu no barbo, usando como biomarcadores a

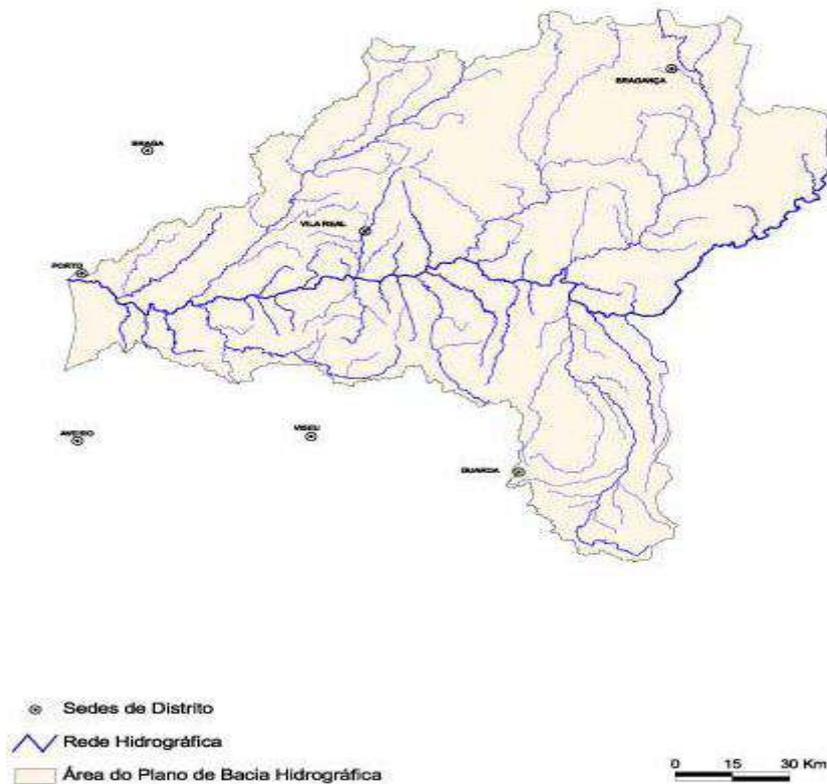
concentração de alguns electrólitos plasmáticos. Os mecanismos envolvidos na toxicidade aguda do Cu no meio aquático, embora relativamente esclarecidos, advêm maioritariamente de um número restrito de espécies, nomeadamente poucos ou nenhuns estudos com o barbo. Assim, devido à presença outrora abundante de barbos (*Luciobarbus bocagei*) na ribeira do Portelo e pelas características apresentadas por este, em particular a contaminação por Cu, foi usado este ciprinídeo para estudar o impacto da exposição aguda ao Cu.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostragem**

Os peixes foram inicialmente amostrados no Rio Sabor, localizado na bacia hidrográfica do Rio Douro, situada no Nordeste Transmontano (Figura 3.1). Os locais de amostragem foram seleccionados tendo em conta o menor impacto antropogénico, nomeadamente através da identificação de factores como p.e. fenómenos de poluição, regularização, más práticas agrícolas ou silvícolas (Teixeira et al., 2006; Oliveira et al., 2007). A amostragem foi realizada numa única época, em Maio de 2012.

Os peixes foram capturados através de pesca eléctrica (aparelho portátil Hans Grassl ELT, com output de corrente contínua, 300-600V), usando a metodologia definida no Manual para a Avaliação Biológica da Qualidade da Água em Sistemas Fluviais segundo a Directiva Quadro da Água: Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola (INAG, 2008).



**Figura 3. 1** - Bacia Hidrográfica do Rio Douro – Rio Sabor (Fonte: INAG).

Após captura os peixes foram transportados vivos, em malas térmicas com água, para o laboratório. Para os ensaios laboratoriais foram considerados unicamente barbos (*Luciobarbus bocagei*) saudáveis, avaliados por inspeção visual - livre de expressões de danos teciduais e que não se encontravam infectados.

### 3.2. Condições dos Ensaios

Os ensaios toxicológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Aquacultura da Escola Superior Agrária, ESA, do Instituto Politécnico de Bragança, localizada na cidade de Bragança, Portugal. Com o objectivo de estudar o efeito do cobre na capacidade de regulação iónica, usou-se um total de 53 peixes.

### 3.2.1. Aclimação dos peixes

Os peixes foram inicialmente aclimatados por um período de 4 dias num Sistema de Aquacultura (Aquaneering Systems ®), composto por 40 tanques de 16L com recirculação de água, sistema de controlo da temperatura (manutenção ao longo da experiência duma temperatura constante de 20°C) e filtros físicos, de carvão ativado e de UV (ultra-violeta), para manutenção duma boa qualidade da água, com fotoperíodo 16h/8h e alimentados uma vez por dia, com ração comercial.



**Figura 3. 2** - Tanques usados na aclimação dos peixes.

Os parâmetros da qualidade da água no período de aclimatação foram medidos ao 4º dia, os valores de pH, de temperatura (° C), oxigénio dissolvido (mg/L e %), condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L) foram obtidos por sonda multiparamétrica HANNA HI9828. A análise da dureza da água foi realizada por meio de titulação, de acordo com recomendações da APHA (1980).

### 3.2.2. Ensaios de Exposição Aguda ao Cobre

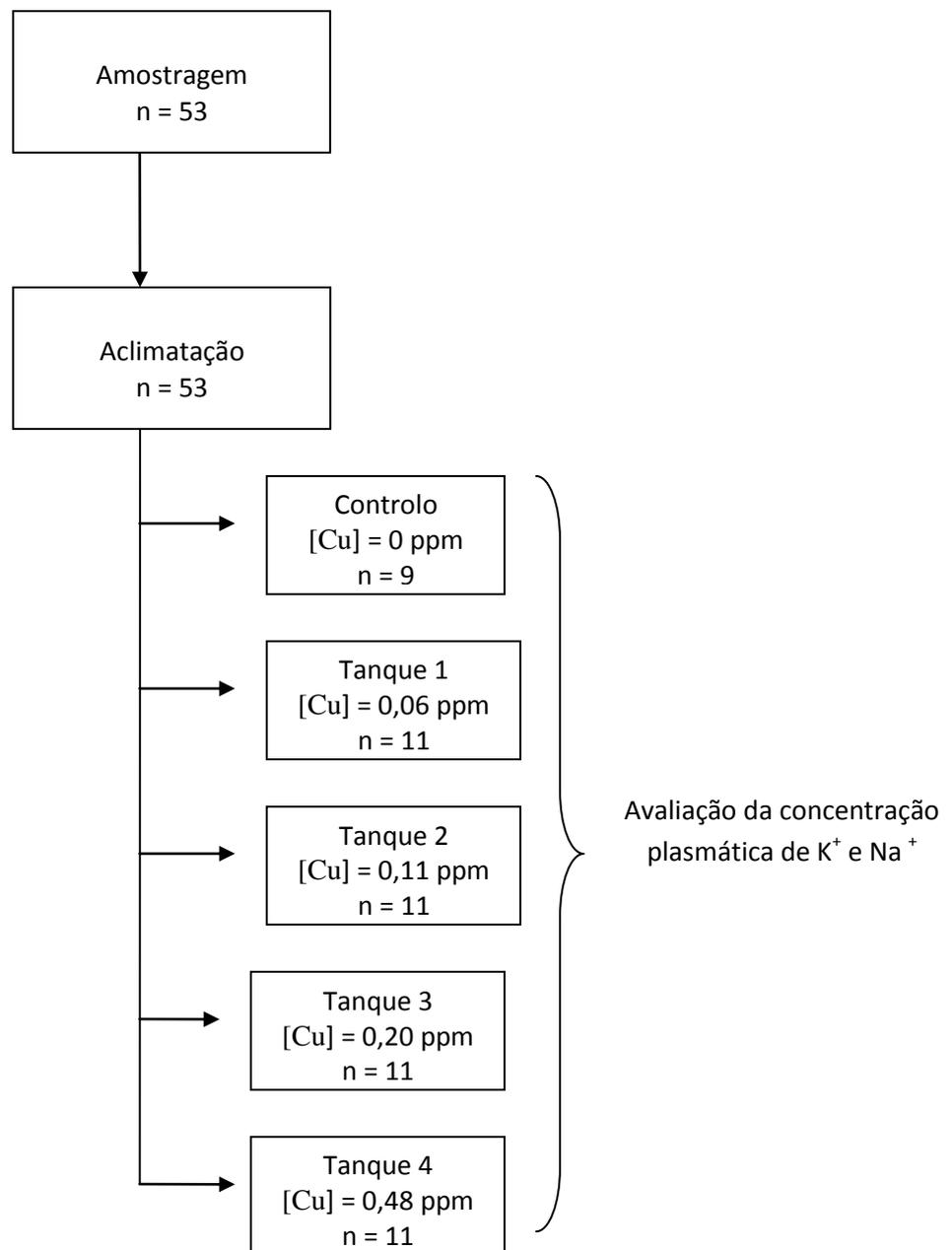
Os ensaios toxicológicos foram realizados com a espécie *Luciobarbus bocagei*, como referido, e foram efectuados em sistema estático, sem alimentação dos peixes. Foram usados tanques plásticos de cor branca, com tampa, de 80 L de capacidade (volume dos ensaios 60 L), aerificados por meio de bombas tipo de aquário, fotoperíodo de 16h/8h e à temperatura ambiente (Figura 3.3)



**Figura 3.3** - Exemplo dos tanques usados nos ensaios de exposição ao cobre.

A água de diluição usada nos ensaios foi idêntica à dos tanques de aclimatação e as diferentes concentrações de cobre testadas foram obtidas à custa de solução padrão certificada de cobre a 1000 ppm (Merck). Foram ensaiadas 4 concentrações distintas, para além do ensaio controlo (branco), conforme esquema da figura 3.4. Assim, os peixes foram

distribuídos de forma aleatória, por 5 tanques, com um total de 60 L de água para cada tanque. Os tanques foram identificados numericamente de 1 a 4 para as diferentes concentrações de cobre testadas e tanque controlo para os peixes expostos á água sem cobre. Um total de 9 indivíduos foi utilizado como controlo dos ensaios, no denominado tanque controlo (branco). Os restantes tanques, com 11 barbos cada, apresentavam as seguintes concentrações de cobre: tanque 1 = 0,06 ppm, tanque 2 = 0,11 ppm, tanque 3 = 0,20 ppm e tanque 4 = 0,48 ppm (figura 3.4).



**Figura 3. 4** - Esquema representativo da metodologia usada com os ensaios.

Em todos os tanques, os barbos foram frequentemente observados durante o período do ensaio, para avaliar os seus comportamentos e as suas condições vitais. Sempre que algum dos peixes apresentava ausência total de movimento, era retirado e procedia-se à metodologia de recolha de amostras. Após as 96h deu-se por concluído o período de exposição e os restantes peixes, bem como os do tanque controlo, foram também processados (metodologia de recolha de amostras).

Os parâmetros da qualidade da água foram monitorizados diariamente durante os ensaios: pH, temperatura, oxigénio dissolvido, condutividade e Sólidos Totais Dissolvidos, conforme metodologia já referida, por meio de sonda. A análise da dureza da água foi realizada por meio de titulação (APHA, 1980), de 48h/48h. A quantificação dos teores de cobre na água foi realizada no início dos ensaios.

Os barbos utilizados nestes ensaios apresentavam um comprimento médio de 13 cm e um peso médio de 17g. A densidade média de carga obtida nos tanques ensaio (1 a 4) foi de 3,5 g/L e foi superior à do tanque controlo (tabela 3.1). Não foi possível determinar a idade dos peixes, pela leitura do anel anual das escamas, devido à sua reduzidíssima dimensão, no entanto atendendo ao seu comprimento estimou-se uma idade aproximada de 2 anos.

O factor de condição (*K*) dos peixes foi determinado no fim dos ensaios:

$$K = \text{peso (g)} / (\text{comprimento (cm)})^3 \times 100.$$

**Tabela 3. 1** - Condições dos tanques, usados no ensaio de toxicidade ao Cu.

<i>Tanques</i>	<i>[Cu]</i> <i>(ppm)</i>	<i>Volume</i> <i>(L)</i>	<i>Nº de</i> <i>Peixes</i>	<i>Densidade</i> <i>em peso</i> <i>(g/L)</i>	<i>Densidade em</i> <i>comprimento</i> <i>(cm/L)</i>
<b>Controlo</b>	0	60	9	1,79	1,73
<b>Tanque 1</b>	0,06	60	11	3,33	2,39
<b>Tanque 2</b>	0,11	60	11	4,09	2,56
<b>Tanque 3</b>	0,20	60	11	3,19	2,31
<b>Tanque 4</b>	0,48	60	11	3,43	2,35

No final dos ensaios toda a água utilizada foi descartada após precipitação do Cu por hidroxilação alcalina adicionando hidróxido de sódio. O metal precipitado foi acondicionado em frascos para posterior descarte conforme as normas legais.

Durante a fase de aclimação e durante os ensaios de exposição ao cobre, o manuseamento dos peixes seguiu sempre as directrizes instituídas para o bem-estar animal.

### 3.3. Recolha de Amostras Biológicas

Os peixes foram processados durante os ensaios de exposição ao cobre quando identificados como mortos - ausência de movimento natatório, ausência de movimento nas brânquias ou quando não reagiam ao toque na barbatana caudal, e no final dos ensaios, para os restantes peixes.

Para a recolha das amostras biológicas, os barbos foram anestesiados (éter monofenílico de etilenoglicol, MERCK S34067 128) e de seguida medidos os parâmetros morfométricos de comprimento e peso, usando balança de precisão (Modelo KERN 440-21A) e régua.

As amostras de sangue foram recolhidas por punção da veia caudal, usando seringas heparinizadas e o sangue recolhido em eppendorfs refrigerados. O sangue foi centrifugado a 3 000 rpm/15 min sob refrigeração (Centrifuge 5415 R) e procedeu-se à recolha do plasma, com a pipeta de Pasteur. As amostras foram congeladas até ao momento de análise.

No final determinou-se o sexo de todos os peixes utilizados neste trabalho.

### 3.4. Determinações Analíticas

#### **Dureza total da água**

Foi utilizando o método titrimétrico do EDTA, baseado na reacção do ácido etilendiaminatetracético (EDTA) ou seus sais de sódio que formam complexos solúveis, quelatos, com certos catiões metálicos.

Para cada uma das determinações da dureza da água, foram transferidos 50 mL de água, para erlenmeyer de 200 mL e adicionou-se a solução tampão de  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  até pH 10 (cerca de 1 mL) e posteriormente adicionaram-se 6 gotas da solução indicadora de Negro de Eriocromo T.O passo seguinte foi titular com a solução de EDTA 0,01M e obter o ponto da viragem da coloração da amostra em análise. Faz-se um branco com água destilada e subtraiu-se o volume de EDTA gasto nesta titulação ao volume de EDTA gasto na titulação da amostra. A diferença foi o volume considerado para cálculo. As determinações foram feitas em duplicado.

O cálculo da dureza de água foi feito considerando a seguinte fórmula:

$$\text{Dureza total (mg/L CaCO}_3\text{)} = 1000 \times \text{mL EDTA titulado} / \text{mL da amostra}$$

### **Quantificação de metais e electrólitos**

Para a quantificação do cobre na água, foram colhidas amostras de água dos tanques, directamente em frascos de polietileno de 20 mL, previamente descontaminados em ácido nítrico a 10% e enxaguadas com água destilada e desionizada. As amostras foram analisadas por espectrofotometria de absorção atómica de chama (Philips PU9100X) e a determinação do cobre foi feita tendo em conta uma recta padrão.

Para a quantificação dos electrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) o plasma foi diluído entre 100 a 500 vezes, com água ultrapura (Reverse osmose – “Water Purification System”- Series WIN Topway Global, Inc), de forma a totalizar aproximadamente 6 mL para análises. As concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram determinadas, tal como anteriormente, por espectrofotometria de absorção atómica de chama e por recta padrão. Os resultados da concentração em electrólitos foram apresentados em mM/L, tendo em conta o peso molar do  $\text{Na}^+$  e do  $\text{K}^+$ .

### **3.5. Análise Estatística**

A análise estatística foi feita usando o programa SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Primeiramente foram elaborados o teste de Shapiro-Wilk com o objectivo de demonstrar a existência de normalidade dos parâmetros, enquanto para testar a homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene.

Foram comparados os parâmetros dos peixes expostos a diferentes concentrações de cobre, usando o teste Anova: factor de condição ( $K$ ), comprimento e concentrações de electrólitos no plasma ( $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ ). Nas situações em que a ANOVA indicou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, procedeu-se à realização de testes de comparações múltiplas de médias (Post-Hoc). Dada a existência de um número diferente de observações por tratamento, nos casos em que se verificou existir homogeneidade das variâncias para além da normalidade, optou-se pelo teste Hochberg. Quando a homogeneidade das variâncias estava em causa, utilizou-se o teste de Games-Howell para as comparações múltiplas de médias após ANOVA. Nos casos de violação

do pressuposto de homocedasticidade, procedeu-se à ANOVA com correcção dos graus de liberdade, através dos testes de Wesch e Brown-Forsythe

As relações entre concentrações de electrólitos no plasma,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e foram avaliadas por correlações de Pearson.

Foi considerado o nível de significância de 5%.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Aclimação**

Na fase de aclimação que decorreu por um período de 4 dias, os parâmetros qualitativos da água da aclimatização, medidos ao 4º dia, encontram-se na tabela 4.1.

De um modo geral os parâmetros determinados encontram-se nos intervalos desejáveis (OECD. 1992). No entanto, os valores do oxigénio no tanque de aclimação 2 encontravam-se ligeiramente aquém do óptimo. Apesar disso não foram registadas mortes de peixes durante este período.

**Tabela 4. 1 - Parâmetros da qualidade da água de aclimação.**

<i>Parâmetros</i>	<i>Tanque 1</i>	<i>Tanque 2</i>	<i>Tanque 3</i>
<b>Condutividade (µS/Cm)</b>	356	350	350
<b>O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	6,78 (86,8 %)	5,16 (66,7 %)	6,5 (83,2 %)
<b>TDS (ppm)</b>	183	175	175
<b>pH</b>	8,05	7,85	8,16
<b>T (° C)</b>	24,12	23,42	22,56
<b>Dureza da água (mg/ L)</b>		58	

O<sub>2</sub>- Oxigénio; TDS- Sólidos Totais Dissolvidos; T- Temperatura.

## 4.2. Ensaio de exposição aguda ao Cu

### 4.2.1. Qualidade da água

Os resultados obtidos da análise de Cu da água do tanque controlo e tanques 1 a 4, encontra-se na tabela 4.2. Conforme esperado, no tanque controlo não foi detectado cobre. A concentração do Cu, nos tanques 1 a 3, sofreu aumentos geométricos com factor médio de 1,8 e no tanque 4 com factor de 2,4.

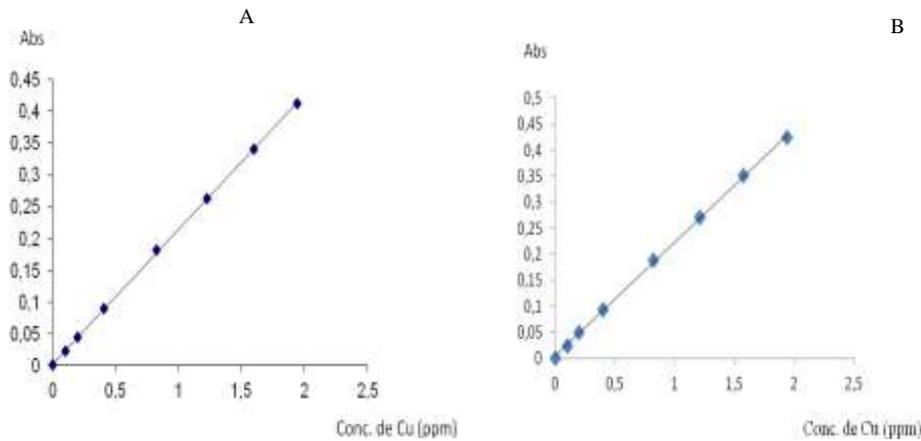
**Tabela 4. 2 - Concentração do Cu nas águas dos tanques de ensaio.**

	<i>Cu (ppm)</i>
Tanque controlo	0
Tanque 1	0,059 ≈ 0,06
Tanque 2	0,114 ≈ 0,11
Tanque 3	0,203 ≈ 0,20
Tanque 4	0,476 ≈ 0,48

As concentrações de Cu testadas, tentaram representar as concentrações presentes na água, quer junto à antiga mina do Portelo, quer após o derrame das escombrelas, na ribeira Portelo. Foram detectados valores de concentração do Cu na água, junto à antiga

área de mineração e no rio Sabor após a confluência da ribeira, até 0,656 ppm e 0,162 ppm, respectivamente.

Como a quantificação do Cu na água não foi feita toda na mesma altura, apresentam-se as rectas de calibração usadas na Figura 4.1 (A e B). Com base nos resultados observados, pode-se concluir que a curva de calibração está de forma linear com as concentrações das soluções analisadas e que a margem de erro foi pequena, considerando que o coeficiente linear (R) apresentou um valor muito próximo de 1.



**Figura 4. 1** - A: Curva de calibração para cobre (Linearidade  $R^2=0,99$ ; Equação da recta:  $y= 0,2119x + 0,0021$ ); B: Curva de calibração para cobre (Linearidade  $R^2=0,99$ ; Equação da recta:  $y= 0,2196x + 0,004$ ).

Os parâmetros da qualidade de água determinados durante o período do ensaio experimental, de exposição aguda ao Cu, encontram-se na tabela 4.3. Em particular, a dureza da água foi determinada de dois em dois dias, nos tanques controlo e tanques de exposição ao Cu, os restantes parâmetros foram determinados diariamente durante a duração dos ensaios. No tanque 1 (0,06 ppm), tanque 2 (0,11 ppm) e tanque 3 (0,20 ppm), os ensaios tiveram a duração de 72 h. O tanque 4 (0,48 ppm) foi o único em que o ensaio teve a duração sensivelmente de 24 horas, mas no qual os parâmetros da qualidade da água foram medidos no início e no fim da exposição ao Cu (de manhã e à noite). No tanque controlo foram monitorizados os parâmetros diariamente, durante as 96 horas.

**Tabela 4. 3** - Parâmetros da qualidade da água nos tanques de ensaio (M±DP).

	<i>Controlo</i> <i>(0 ppm)<sup>a</sup></i>	<i>T1</i> <i>(0,06 ppm)<sup>b</sup></i>	<i>T2</i> <i>(0,11 ppm)<sup>b</sup></i>	<i>T3</i> <i>(0,20 ppm)<sup>b</sup></i>	<i>T4</i> <i>(0,48ppm)<sup>c</sup></i>
<b>Condutividade</b> ( $\mu\text{S/cm}$ )	361,50 $\pm$ 13,96	403,67 $\pm$ 64,47	359,67 $\pm$ 22,68	360,67 $\pm$ 10,69	361,50 $\pm$ 9,19
<b>O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	8,24 $\pm$ 0,31	5,20 $\pm$ 0,62	5,99 $\pm$ 0,89	7,20 $\pm$ 0,26	7,30 $\pm$ 0,57
<b>TDS (ppm)</b>	180,25 $\pm$ 6,70	201,67 $\pm$ 31,50	180,00 $\pm$ 11,53	180,67 $\pm$ 5,13	180,5 $\pm$ 4,95
<b>pH</b>	8,59 $\pm$ 0,30	7,71 $\pm$ 0,19	8,14 $\pm$ 0,32	8,25 $\pm$ 0,40	8,02 $\pm$ 0,65
<b>T (°C)</b>	21,55 $\pm$ 0,56	23,44 $\pm$ 0,65	23,21 $\pm$ 0,67	21,45 $\pm$ 0,62	21,27 $\pm$ 0,54
<b>Dureza da água</b> (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	101 $\pm$ 18,30	33,00 $\pm$ 4,24	54,00 $\pm$ 16,97	200	100

a: n = 4; b: n= 3; c: n=2; O<sub>2</sub>: Oxigénio; TDS: Sólidos Totais Dissolvidos; T: Temperatura.

Neste estudo os valores da dureza da água situaram-se entre um mínimo e um máximo de 33 e 200 mg/ L de CaCO<sub>3</sub>, respectivamente, encontrando-se por isso dentro dos valores estipulados pela OECD (1992), os quais devem situar-se entre 10 a 250 mg/L CaCO<sub>3</sub>.

Quanto ao pH, é possível verificar que os valores estão próximos ao recomendado (6,0 a 8,5), contudo no tanque controlo (0 ppm de Cu) o valor de pH extrapolou ligeiramente o valor máximo recomendado (OECD, 1992), mas é tida essa variação como não interferindo significativamente nos resultados.

A concentração de oxigénio dissolvida deve ser pelo menos 80 % (OECD, 1992), o que foi verificado neste ensaio, a excepção do tanque 1 (0,06 ppm de Cu), e do tanque 2 (0,11 ppm de Cu) que apresentaram valores um pouco aquém do esperado, 5,20 (mg/L)  $\pm$  0,62 e 5,99 (mg/L)  $\pm$  0,89 respectivamente.

#### 4.2.2. Parâmetros morfométricos

No tanque controlo que representa o branco, não houve alterações comportamentais, nem anomalias observáveis dos peixes durante o período do ensaio. Igualmente todos os peixes permaneceram vivos durante todo o ensaio. Os resultados dos parâmetros morfométricos para estes barbos encontram-se na tabela 4.4.

**Tabela 4. 4** - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque controle ([Cu] = 0 ppm).

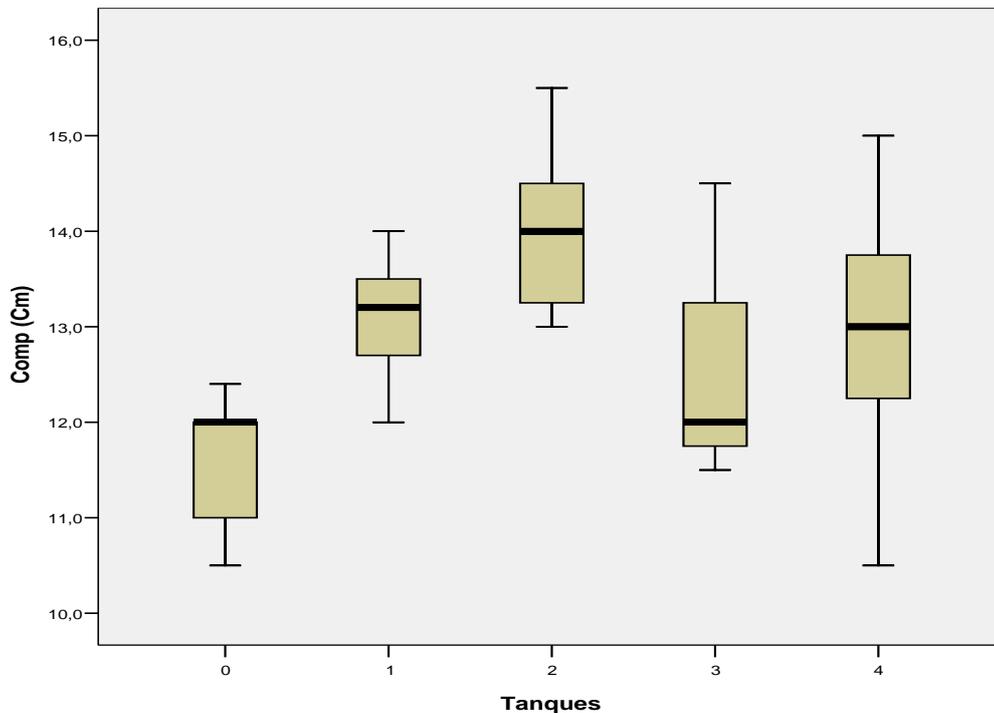
<i>Animais</i>	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Sexo</i>	<i>K</i>
1	12,0	12,4	N.D.	0,72
2	10,5	9,9	M	0,86
3	12,0	12,4	M	0,72
4	11,2	12,3	M	0,88
5	12,0	11,8	M	0,68
6	12,4	14,7	M	0,77
7	12,0	13,1	M	0,76
8	11,0	11,9	M	0,89
9	10,5	9,0	M	0,78
<b>Média ± DP</b>	<b>11,51 ± 0,72</b>	<b>11,94 ± 1,67</b>		<b>0,78 ± 0,075</b>

N.D., não determinado

Estes peixes possuíam um comprimento médio de 12 cm e peso médio de 12 g. Relativamente ao índice de robustez (*K*), este apresentou uma média de 0,78.

Através da análise das gónadas, foi possível verificar que estes barbos eram todos machos.

Os resultados dos parâmetros morfométricos para os barbos dos tanques 1 a 4 encontram-se nas tabelas 4.5 a 4.8. Todos os peixes usados nos ensaios de exposição ao cobre eram machos, à semelhança dos peixes do tanque controle.

**Figura 4. 2** - Distribuição do comprimento médio dos barbos por tanque.

Os peixes dos tanques de ensaio, tanque 1 (0,06 ppm), tanque 2 (0,11 ppm), tanque 3 (0,20 ppm) e tanque 4 (0,48 ppm) apresentaram comprimentos médios estatisticamente superiores aos do tanque controlo (Figura 4.2). Apesar disso, essa diferença não se deve reflectir em idade dos peixes, já que se trata de cerca de um centímetro.

**Tabela 4. 5** - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 1 ([Cu] = 0,06 ppm).

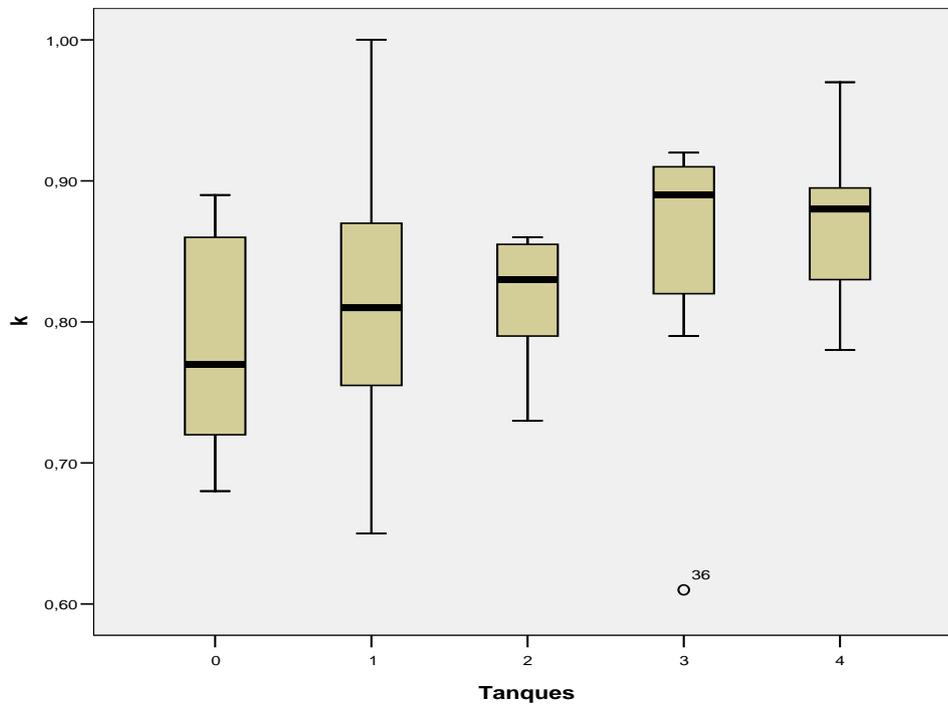
<i>Animais</i>	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Sexo</i>	<i>K</i>
1	13,5	18,3	M	0,74
2	12,0	17,3	M	1,00
3	13,0	18,7	M	0,85
4	13,5	18,9	M	0,77
5	13,5	21,9	M	0,89
6	14,0	22,2	M	0,81
7	13,2	20,8	M	0,90
8	13,0	17,2	M	0,78
9	13,5	16,1	M	0,65
10	12,4	16,1	M	0,84
11	12,0	12,0	M	0,69
<b>Média ± DP</b>	<b>13,05 ± 0,66</b>	<b>18,14 ± 2,94</b>		<b>0,81 ± 0,10</b>

Relativamente ao peso dos barbos, é notável que os animais do ensaio da toxicidade de Cu possuem um peso médio superior aos dos animais de tanque controlo, mas esse parâmetro não teve influência nos resultados, uma vez em que foi unicamente utilizado como um factor para a obtenção de índice de robustez.

**Tabela 4. 6** - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 2 ([Cu] = 0,11 ppm)

<i>Animais</i>	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Sexo</i>	<i>K</i>
1	13,0	16,8	M	0,76
2	14,5	22,4	M	0,73
3	15,5	30,4	M	0,82
4	14,5	25,8	M	0,85
5	13,5	18,1	M	0,74
6	13,0	19,0	M	0,86
7	13,0	18,8	M	0,86
8	14,0	23,6	M	0,86
9	13,5	20,2	M	0,82
10	14,5	25,2	M	0,83
11	14,5	25,4	M	0,83
<b>Média ± DP</b>	<b>13,95 ± 0,82</b>	<b>22,34 ± 4,16</b>		<b>0,81 ± 0,048</b>

O índice de robustez ( $K$ ) relaciona o peso total do peixe com seu comprimento, sendo um indicador das reservas energéticas a longo tempo. Embora se trate de um parâmetro que não é específico, pode fornecer informação sobre o efeito de contaminantes crónicos e vários estudos relacionam este indicador com a exposição aos metais.



**Figura 4.3** - Distribuição do índice de robustez ( $K$ ) médio dos barbos por tanque.

Em geral, a presença crónica de metais conduz a uma diminuição dos valores de  $K$  (Laflamme et al., 2000; Eastwood & Couture, 2002; Rajotte et al., 2003), outros descrevem um aumento de  $K$  (Figueiredo-Fernandes et al., 2006), nomeadamente com metais pesados (Fernandes et al., 2008). A determinação de alguns índices relacionados com o crescimento e a reprodução em peixes é útil na avaliação crónica da toxicidade dos metais.

Assim, neste ensaio de toxicidade aguda não seriam de esperar variações no  $K$  como resposta à presença do Cu. De facto, o  $K$  médio dos peixes dos tanques de ensaio (1 a 4) não apresentou diferenças, comparativamente aos peixes do tanque controlo (Figura 4.3).

**Tabela 4. 7** - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 3 ([Cu] = 0,20 ppm).

<i>Animais</i>	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Sexo</i>	<i>K</i>
1	14,5	24,7	M	0,81
2	14,0	24,1	M	0,88
3	13,5	19,5	M	0,79
4	12,0	15,7	M	0,91
5	11,5	9,3	M	0,61
6	11,5	13,6	M	0,89
7	12,0	15,8	M	0,91
8	13,0	20,3	M	0,92
9	12,0	14,4	M	0,83
10	13,0	20,08	M	0,91
11	11,5	13,7	M	0,90
<b>Media ± DP</b>	<b>12,59 ± 1,07</b>	<b>17,38 ± 4,76</b>		<b>0,85 ± 0,092</b>

Em termos de mortalidade, no tanque 1 (0,06 ppm) verificou-se que ao fim de 24 h, 4 peixes (36,4%) foram considerados mortos e após mais 48 h os 7 peixes restantes. Por outro lado, no tanque 2 (0,11 ppm), verificou-se que 7 dos peixes (63,6%) reuniram as condições para serem considerados mortos, após as 24 h, e os 4 restantes peixes após mais 48 h. No tanque 3 (0,20 ppm) verificou-se que ao fim de 24 h, 6 peixes (54,5%) foram considerados mortos e após mais 48 h os 5 peixes restantes.

O tanque 4 (0,48 ppm) foi o único em que ao fim sensivelmente de 24 horas todos os peixes (100%) foram considerados mortos. Considerando que neste tanque os peixes se encontravam expostos à maior concentração de cobre testada, esta resposta dever-se-á ao elevado potencial tóxico deste elemento. Na generalidade, a presença de metais pesados na água poderá induzir alterações na estrutura das brânquias, afectando a capacidade respiratória, bem como também a regulação iónica e a regulação osmótica dos peixes (Matrinez et al., 2004).

Os sintomas de exposição ao cobre incluíram, para além dos critérios definidos no ponto 3.3, natação instável com movimentos bruscos, perda de equilíbrio e aumento da excitabilidade dos animais. Além dessas anomalias comportamentais, alguns peixes permaneceram suspensos em posição quase horizontal, alguns perto da superfície da água evidenciando a perda de equilíbrio e por conseguinte uma reacção da contaminação de cobre. De acordo com Atchison et al. (1987) estas alterações são frequentemente observadas nos peixes como resposta à exposição a metais. Muitos estudos relatam que a exposição, a bioacumulação e a biotransformação dos

contaminantes traduzem-se numa resposta biológica a nível celular e molecular, alterações teciduais e respostas fisiológicas dos peixes, desta forma, dependendo do grau de contaminação, surgem as respostas locomotora - anomalias comportamentais (Varanka et al., 2001; Fontaínhas-Fernandes, 2005).

**Tabela 4. 8** - Parâmetros morfométricos dos barbos do tanque 4 ([Cu] = 0,48 ppm).

<i>Animais</i>	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Sexo</i>	<i>K</i>
1	15,0	29,9	M	0,89
2	13,5	20,1	M	0,82
3	14,0	21,4	M	0,78
4	14,0	24,6	M	0,90
5	13,5	21,2	M	0,86
6	13,0	17,1	M	0,78
7	12,5	17,2	M	0,88
8	12,0	15,4	M	0,89
9	10,5	11,0	M	0,95
10	10,5	11,2	M	0,97
11	12,5	16,5	M	0,84
<b>Media ± DP</b>	<b>12,82 ± 1,42</b>	<b>18,69 ± 5,58</b>		<b>0,87 ± 0,061</b>

### 4.2.3. Electrólitos

A quantificação do sódio e do potássio plasmático foi feita após diluições, conforme tabela 4.9. Com esta diluição pretendeu-se que o sinal da amostra ficasse na região linear da curva de calibração.

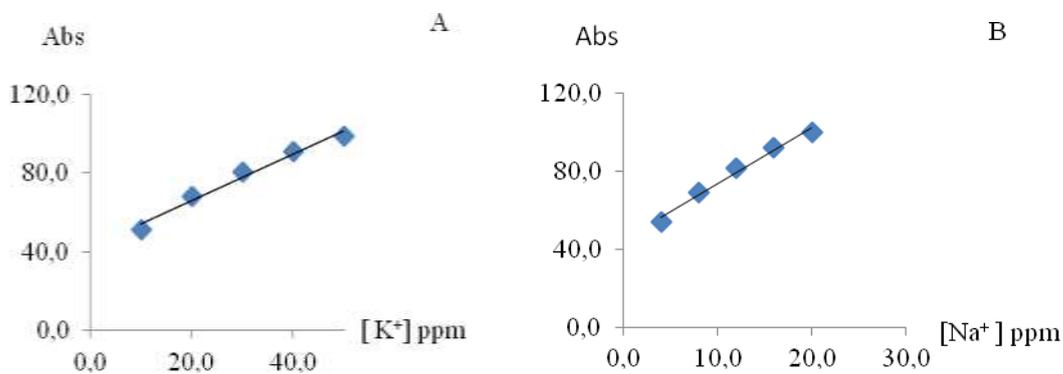
Como não se conseguiu tirar sangue de todos os peixes (N.D.) no final obtiveram-se para análise 8 plasmas do tanque controlo, 7 plasmas do tanque 1, e 9 plasmas dos tanques 2, 3 e 4.

**Tabela 4. 9** - Diluições efectuadas ao plasma dos barbos utilizados nos ensaios de exposição ao cobre.

<i>Peixe</i>	<i>Controlo</i> (0 ppm)	<i>Tanque 1</i> (0,06 ppm)	<i>Tanque 2</i> (0,11 ppm)	<i>Tanque 3</i> (0,20 ppm)	<i>Tanque 4</i> (0,48 ppm)
<b>1</b>	191,29	125,50	172,92	132,29	574,33
<b>2</b>	271,92	278,12	195,68	282,89	N.D.
<b>3</b>	270,07	213,19	224,76	502,92	N.D.
<b>4</b>	N.D.	120,23	234,37	242,34	209,11
<b>5</b>	190,28	ND	N.D.	175,23	338,19
<b>6</b>	421,46	ND	170,15	362,91	243,58
<b>7</b>	184,49	ND	95,86	148,91	153,69
<b>8</b>	180,96	ND	266,12	N.D.	208,51
<b>9</b>	477,83	146,58	113,72	183,59	262,96
<b>10</b>		155,23	228,51	N.D.	172,19
<b>11</b>		144,20	N.D.	259,89	203,73
<b>n</b>	8	7	9	9	9

N.D. - Não Determinado.

As rectas de calibração usadas para a determinação da concentração do  $K^+$  e  $Na^+$  encontram-se na figura 4.4 (A e B). Com base nos resultados observados, pode-se concluir que as curvas de calibração estão de forma linear com as concentrações das soluções analisadas e que a margem de erro foi pequena, considerando que o coeficiente linear (R) apresentou um valor muito próximo de 1.



**Figura 4. 4** - A: Curva de calibração para  $K^+$  plasmático (Linearidade  $R^2=0,98$ ; Equação da recta:  $y=1,179x + 42,61$ ); B: Curva de calibração para  $Na^+$  plasmático (Linearidade  $R^2=0,99$ ; Equação da recta:  $y=2,88x + 44,98$ ).

A concentração do potássio plasmático, dos peixes expostos a diferentes concentrações de cobre, encontra-se na tabela 4.10.

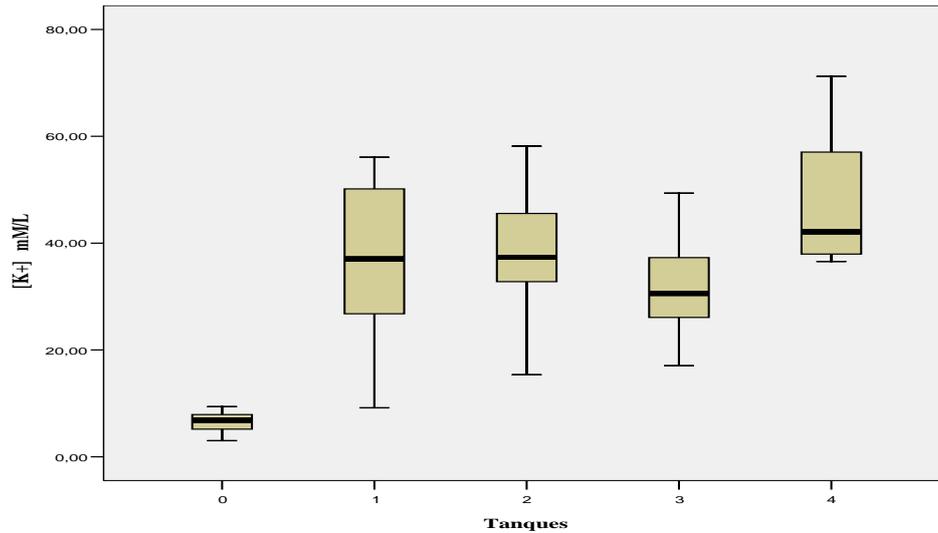
**Tabela 4. 10** - Concentração de K<sup>+</sup> plasmático dos peixes nos diferentes tanques (mM/L).

<i>Peixe</i>	<i>Controlo (0 ppm)</i>	<i>T 1 (0,06 ppm)</i>	<i>T2 (0,11 ppm)</i>	<i>T3 (0,20 ppm)</i>	<i>T4 (0,48 ppm)</i>
<b>1</b>	6,86	46,16	45,55	17,73	63,88
<b>2</b>	7,87	56,08	36,97	26,09	N.D.
<b>3</b>	7,95	28,74	54,05	48,91	N.D.
<b>4</b>	N.D.	9,16	58,15	28,72	43,37
<b>5</b>	3,01	N.D.	N.D.	27,38	71,21
<b>6</b>	5,36	N.D.	32,79	37,29	50,20
<b>7</b>	6,80	N.D.	15,36	17,04	36,57
<b>8</b>	4,98	N.D.	40,45	N.D.	37,40
<b>9</b>	9,38	24,80	16,05	32,85	49,34
<b>10</b>		54,13	37,35	N.D.	40,86
<b>11</b>		37,06	N.D.	32,41	38,49
<b>Média ±DP</b>	<b>6,53 ± 2,01<sup>a</sup></b>	<b>36,59 ± 16,99<sup>b</sup></b>	<b>37,41 ± 14,77<sup>b</sup></b>	<b>29,82 ± 9,79<sup>b</sup></b>	<b>47,92 ± 12,27<sup>b</sup></b>

Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas - Teste comparação múltiplas de médias através do Teste Game-Howel para um nível de significância 5%; N.D: Não determinado.

Os resultados mostram que o valor médio do potássio plasmático dos barbos controlo é de 6,53 mM/L e que este valor é significativamente menor comparativamente aos barbos expostos ao cobre. Por outro lado, os valores do potássio plasmático, obtidos para os peixes dos tanques expostos ao cobre não variaram entre si (Tabela 4.10 e Figura 4.5).

Não foi encontrada nenhuma relação significativa entre os níveis plasmáticos do potássio e a concentração do cobre na água.



**Figura 4.5** - Distribuição média do  $K^+$  plasmático por tanque.

A tabela 4.11 apresenta as concentrações médias de sódio plasmático ( $Na^+$ ) obtidas do tanque controle e dos tanques 1 a 4.

**Tabela 4.11** - Concentração de  $Na^+$  plasmático dos peixes nos diferentes tanques (mM/L).

<i>Peixe</i>	<i>Controlo</i> <i>(0 ppm)</i>	<i>T1</i> <i>(0,06 ppm)</i>	<i>T2</i> <i>(0,11ppm)</i>	<i>T3</i> <i>(0,20 ppm)</i>	<i>T4</i> <i>(0,48 ppm)</i>
<b>1</b>	186,56	60,88	50,72	69,69	12,32
<b>2</b>	231,83	111,82	78,08	61,63	N.D.
<b>3</b>	225,68	151,08	56,71	77,65	N.D.
<b>4</b>	N.D.	121,16	83,83	39,47	25,96
<b>5</b>	196,05	N.D.	94,28	75,99	25,64
<b>6</b>	282,64	N.D.	88,91	59,10	36,13
<b>7</b>	191,64	N.D.	108,93	32,44	21,63
<b>8</b>	189,50	N.D.	113,96	N.D.	2,58
<b>9</b>	265,85	119,15	97,24	60,19	10,41
<b>10</b>		59,60	56,71	N.D.	25,54
<b>11</b>		78,88	N.D.	80,81	3,45
<b>Média ±DP</b>	<b>221,22 ± 37,06<sup>c</sup></b>	<b>100,37 ± 34,57<sup>b</sup></b>	<b>85,85 ± 21,45<sup>b</sup></b>	<b>61,89 ± 16,76<sup>b</sup></b>	<b>18,18 ± 11,51<sup>a</sup></b>

Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas - Teste comparação múltiplas de médias através do Teste Game-Howel para um nível de significância 5%; N.D: Não determinado.

Neste caso a concentração plasmática de  $\text{Na}^+$ , nos tanques 1 a 4, é significativamente menor comparativamente ao controlo.

Na Figura 4.6 é possível observar o comportamento do  $\text{Na}^+$  plasmático por tanque.

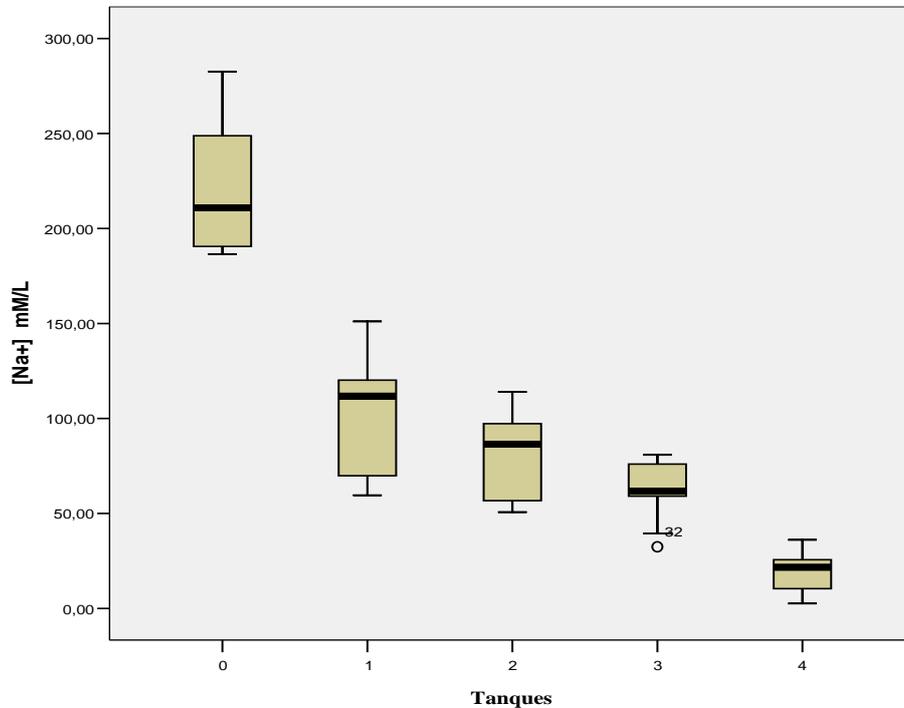


Figura 4. 6 - Distribuição média do  $\text{Na}^+$  plasmático por tanque.

Mazon et al. (2002) observou também diminuição de  $\text{Na}^+$  e aumento do  $\text{K}^+$  plasmático em peixes de água doce, *Prochilodus scrofa*, quando expostos ao cobre durante 96 h. Estes autores, observaram ainda que a exposição ao cobre conduzia a alterações na regulação iónica e que a mudança nos parâmetros hematológicos traduzia uma resposta compensatória à redução da superfície respiratória das brânquias, com o objectivo de permitir a transferência do oxigénio da água para o sangue, possibilitando a sobrevivências dos organismos.

O aumento do  $\text{K}^+$  plasmático e diminuição do  $\text{Na}^+$  foi também observado nos estudos de Fernandes et al. (2007c; 2009), em peixes expostos cronicamente a metais. Segundo estes autores, o aumento do  $\text{K}^+$  plasmático observado em *Liza saliens* ocorreu como ajustamento osmótico, quando tenta compensar a diminuição de outros componentes do soro plasmático.

Mais estudos abordam efeitos dos metais na regulação iónica branquial, incluindo a regulação dos electrólitos plasmáticos. Grossel et al. (2003) examinaram os efeitos

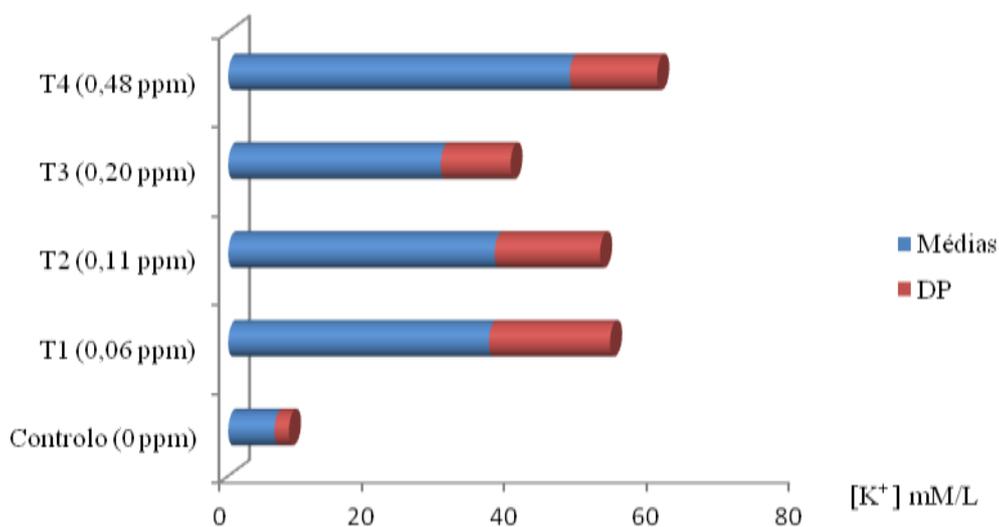
agudos da exposição ao Cu (7 dias) em duas espécies de peixes marinhos, *Raja erinacea* e *Myoxocephalus octodecemspinosus*, a diferentes concentrações, e verificaram que não foram afectadas as concentrações dos electrólitos plasmáticos, em particular o  $\text{Na}^+$  plasmático, e conseqüentemente sugeriram que a actividade da enzima branquial  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATP-ase}$  não foi alterada. Sugeriram que os peixes marinhos são menos sensíveis à contaminação de Cu, comparativamente aos peixes de água doce, já que as elevadas concentrações de catiões na água do mar podem desempenhar alguma protecção contra a toxicidade do Cu. Estes aspectos foram também referidos por Pagenkopf, (1983) e Grossel and Wood, (2002), em que apontam que elevadas concentrações de cálcio e sódio podem reduzir absorção e toxicidade de Cu em água salgada e que as elevadas concentrações desse catiões em água do mar podem ser a razão da menor sensibilidade dos peixes da água do mar.

Resultados semelhantes também foram observados por Wilson & Taylor (1993), diminuição de  $\text{Na}^+$  plasmático e um aumento de  $\text{K}^+$  plasmático, em truta de água doce (*Oncorhynchus mykiss*) durante a exposição aguda letal de cobre. Segundo estes autores, o aumento da concentração de  $\text{K}^+$  durante o ensaio de exposição ao cobre deve-se ao resultado da saída do mesmo electrólito do compartimento intracelular. Sabe-se que  $\text{K}^+$  é dominante nos compartimentos intracelulares e a diluição de iões plasmáticos favorece a saída de  $\text{K}^+$  para o fluido extracelular (Lee et al., 1983; Stuart & Morris, 1985). O aumento de  $\text{K}^+$  seria uma mudança secundária para compensar a perda dos electrólitos plasmáticos (Wilson & Taylor, 1993).

Martinez et al. (2004), investigaram os efeitos morfológicos e fisiológicos da exposição aguda de chumbo (Pb) em *Prochilodus lineatus*, expostos a duas concentrações subletais (24 e 71 mg/L Pb) durante ensaio agudo estático (96h). Analisaram os efeitos morfológicos branquiais e parâmetros sanguíneos, como concentrações plasmáticas de  $\text{Na}^+$ . Para além das lesões histopatológicas observadas nos peixes, para ambas as concentrações de Pb, houve uma significativa diminuição  $\text{Na}^+$  do plasmático nos peixes expostos a 71mg/L de Pb. Segundo estes autores, a diminuição da concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático pode refletir a uma diminuição de taxa de fluxo de sódio, uma vez que a perturbação de mecanismos da regulação iónica por metais normalmente envolve a inibição da actividade da enzima branquial  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ . Assim, no referido estudo a perturbação da actividade desta enzima no *P. lineatus*, leva a uma significativa diminuição de  $\text{Na}^+$  plasmático (Martinez et al., 2004).

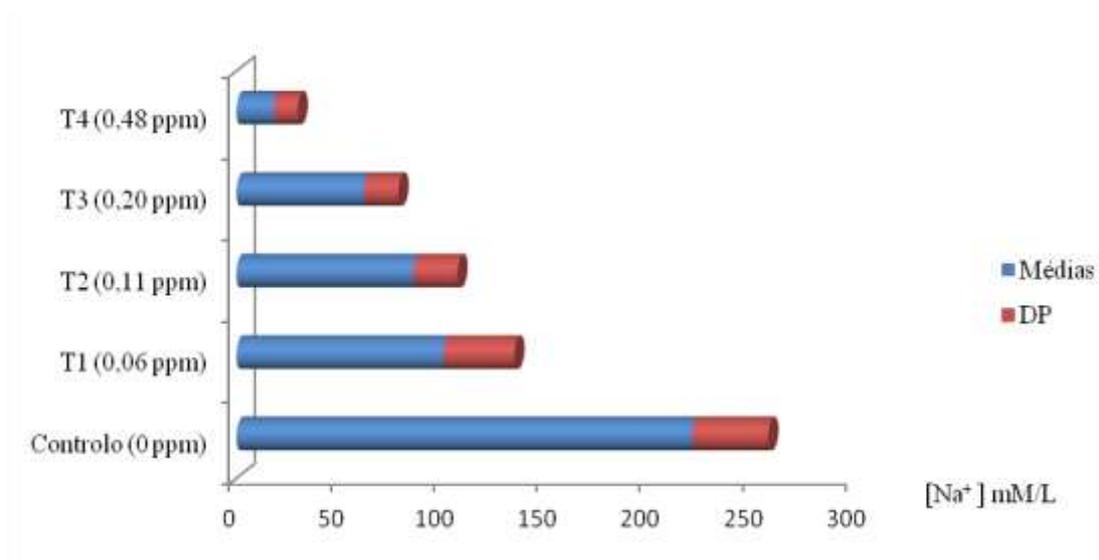
Perdas dos electrólitos plasmáticos tem sido descrita em peixes expostos a metais pesados, (Pratap et al., 1989; Wendelaar Bonga & Lock, 1992; Chowdhury et al., 2004). Uma vez que os peixes de água doce sequestram a maioria de iões necessários para a homeostase, através das brânquias, a diminuição da concentração dos electrólitos plasmáticos é causada aparentemente por um aumento do efluxo de iões através destes órgãos e uma diminuição da absorção activa de iões das células de cloreto (CC) das brânquias (Wendelaar Bonga et Lock, 1992).

O Cu provoca alterações do mecanismo da regulação iónica, tendo como consequência uma variação dos electrólitos do plasma, devido a inibição da actividade da enzima ATPases nas brânquias (Laurén & McDonald, 1985; Li et al., 1998). A osmorregulação é essencial para a sobrevivência de peixes de água doce, uma vez que o ambiente aquático proporciona um elevado gradiente iónico, favorecendo as perdas de iões (Randall et al., 2000; Schmidt-Nielsen, 2002). A enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase regula a captação desses iões na água (Evans et al., 1982; Martinez et al., 2004). É possível observar na Figura 4.7, que neste trabalho a concentração do electrólito  $\text{K}^+$  plasmático não difere significativamente entre os peixes expostos a diferentes concentrações de cobre, mas é evidente que a concentração do  $\text{K}^+$  plasmático de peixes controlo difere dos peixes expostos ao cobre, o que de certo modo vai de acordo com o tal aumento de  $\text{K}^+$  plasmático observado por Fernandes et al. (2007) e Mazon et al. (2002).



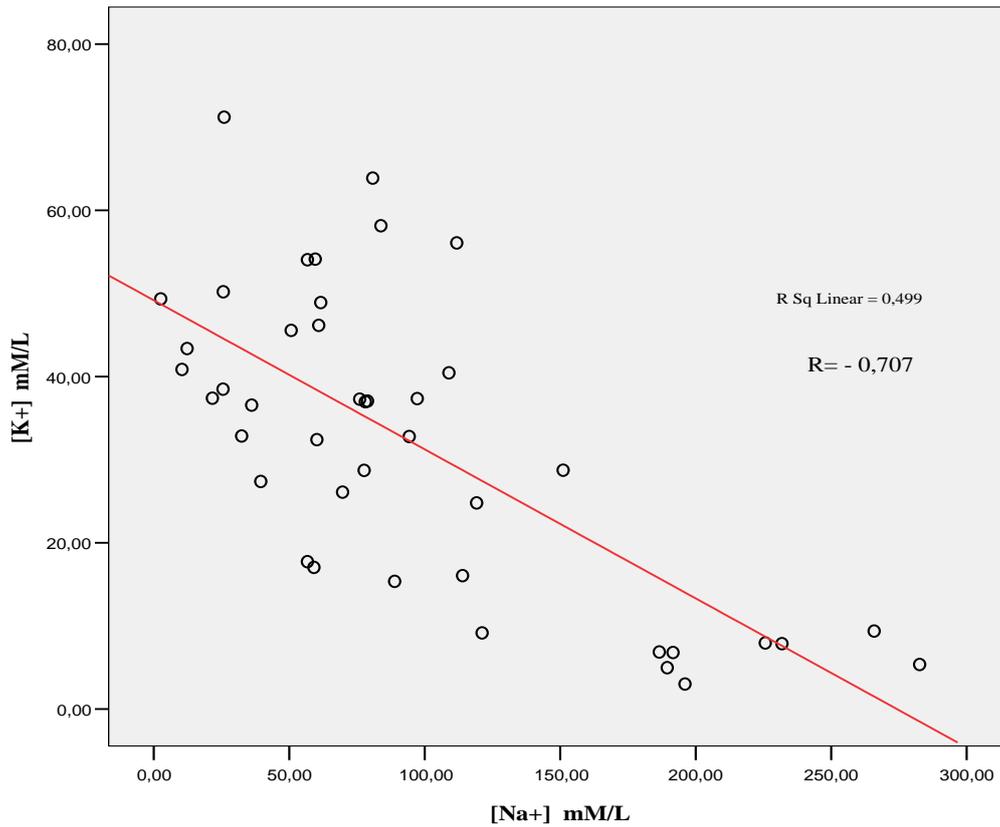
**Figura 4.7** - Concentração média e DP do  $\text{K}^+$  plasmático dos barbos por tanque de ensaio.

Relativamente à concentração de  $\text{Na}^+$ , ela diminui com o aumento da concentração de Cu. Como se observa na Figura 4.8. O  $\text{Na}^+$  diminui significativamente com o aumento da concentração de cobre ( $n= 5$ ;  $r= -0,815$ ;  $p< 0,01$ ), o que sugere que o Cu pode competir com este electrólito, levando à sua diminuição. Os metais com um potencial efeito negativo na regulação iónica podem ser agrupados nas seguintes categorias: os que afectam iões  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , como é o caso do Cu, e os que influenciam o  $\text{Ca}^{2+}$ , designadamente o Zn, de acordo com a afinidade para os substratos (Fernandes, 2007). Assim, o aumento do  $\text{K}^+$  observado neste ensaio pode ser uma medida compensatória, em relação à diminuição do  $\text{Na}^+$ , de modo a manter o equilíbrio iónico, tal como observado por Fernandes et al. (2007c).



**Figura 4. 8** - Concentração média e DP do  $\text{Na}^+$  plasmático dos barbos por tanque de ensaio.

De facto, existe uma correlação negativa entre a concentração dos electrólitos  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  plasmáticos ( $n= 42$ ;  $r = -0,707$ ;  $p <0,01$ ), conforme gráfico da figura 4.9. Sabe-se também que vários solutos influenciam a osmolaridade do plasma, como por exemplo o cálcio (Ahern & Morris, 1998, Rogers et al., 2003). Assim, para além das alterações ocorridas na concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , é possível que outros iões não analisados compensem o balanço iónico.



**Figura 4. 9** - Relação da variação da concentração  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  plasmático (N = 42).

A mortalidade de todos os peixes do tanque 4 (0,48 ppm) observada ao fim de 24 h, poderá ser devida às alterações no equilíbrio iônico e à falta de capacidade compensatória, e também perda da capacidade respiratória, já que a concentração do Cu neste tanque foi a mais elevada.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em estudos da toxicidade o biomarcadores tem sido utilizados e considerados como os mais viáveis para avaliar respostas aos contaminantes, permitindo uma rápida avaliação dos organismos e podem ainda ser indicadores da exposição e/ou efeito dos poluentes (Mayer et al., 1992). Por outro lado, é evidente o crescente número de investigações onde os peixes são usados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (Overstreet, 1988; Teh et al., 1997; Schwaiger et al., 1997; Gundersen et al., 2000; Pacheco & Santos, 2002; Thophon et al., 2003; Barcarolli & Martinez, 2004).

Os biomarcadores utilizados neste estudo, concentração plasmática de electrólitos, mostraram ser adequados já que traduziram uma alteração biológica que expressa a exposição e os efeitos tóxicos do cobre, ou seja traduzem uma relação causa e efeito da exposição dos barbos a este metal. A comparação directa dos valores de toxicidade, obtidos neste estudo com os da literatura, é dificultada pelas diferenças químicas da água (dureza, alcalinidade, pH, temperatura, concentrações de iões maiores, entre outros) que influenciam a toxicidade do Cu. No entanto, mesmo a concentração mais baixa do Cu testada, 0,06 ppm, mostrou ser tóxica.

Vários estudos documentam que diferentes espécies possuem uma variação no grau de tolerância aos metais, como exemplo os *salmonídeos* são muito sensíveis às contaminações com metais (Pelgrom et al., 1997; Lacroix & Hontela, 2004; Niyogi & Wood, 2004), e alguns membros da família de peixes *Percidae* são conhecido como sendo muito tolerantes à toxicidade de metais (Niyogi & Wood, 2004). Contudo, é importante observar que a maioria dos estudos sobre ensaios de toxicidade aguda dos metais é realizada sob condições experimentais diferentes, o regime de exposição, o tamanho, peso e idade dos peixes, o que pode explicar parte da variação, quando comparamos este estudo com outros. Os barbos mostraram ser um bom bioindicador, uma vez que demonstraram sensibilidade à presença do Cu. Além disso, a escolha do barbo enquadra-se na ideia de Sprague (1990), para avaliar um problema local a predominância de uma espécie regional sensível pode ser melhor do que as espécies padronizadas. Por outro lado, os peixes juvenis são os mais sensíveis aos efeitos de Cu de que os peixes adultos, (Howarth & Sprague, 1978), que justifica assim a escolha de barbos juvenis para o ensaio de toxicidade aguda de Cu.

O cobre promove alterações no mecanismo da regulação iónica, conduzindo a uma rápida diminuição dos electrólitos plasmáticos, e conseqüentemente a inibição da actividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias, conduzindo ao influxo de  $\text{Na}^+$  (Laurén & al 1985; Heath, 1995, Mazon et al 2002; Grosell et al., 2003; Taylor et al., 2004). Quanto a exposições aguda a elevada concentração de Cu também podem causar uma rápida destruição do epitélio branquial, originando a morte dos peixes, devido a hipoxemia, desequilíbrio iónico e distúrbio ácido-base (Laurén & McDonald, 1987). Também a  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  plasmático representam parâmetros usados para caracterizar o estado geral da regulação iónica dos peixes (Fernandes et al 2007), embora neste trabalho só tenham sido considerados electrólitos  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Estes electrólitos

normalmente diminuem em ciprinídeos após a exposição a diferentes contaminantes (Jeney et al., 2002; Mazon et al, 2002).

Quanto à utilização do Cu em particular para este ensaio experimental, devido a sua elevada toxicidade, além de ser considerado muito persistente e tóxico mesmo em quantidades vestigiais aos organismos aquáticos, (Woo et al., 2009), o objectivo foi avaliar laboratorialmente o que acontece devido a influência da Mina da Portela.

Os resultados deste trabalho indicam que as alterações nas concentrações dos iões plasmáticos  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  de barbos mostram que a exposição ao cobre durante 96 horas afecta a regulação iónica. Os parâmetros bioquímicos plasmáticos dos peixes mostraram além disso, ser um promissor indicador de exposição aguda e relativamente fácil de executar.

Perante os resultados obtidos neste trabalho, não é de estranhar que a população ictiológica na zona junto à antiga mina do Portelo e no córrego Portelo, após o derrame das escombrelas, tenha desaparecido ou diminuído significativamente. Será de esperar que com a diminuição do teor de metais na água aos poucos seja restabelecido o equilíbrio ecológico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S.M. (1990). Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 1-8.
- Ahern, M.D.; Morris, S. (1998). Accumulation of lead and its effects on Na balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *The Journal of Experimental Zoology*. 281, (4).270-279.
- Alvarado, N. E., Quesada, I., Hylland, K., Marigómez, I., & Soto, M. (2006). Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic Toxicology*, 77(1), 64-77.
- APHA. (1980). American Public Health Association - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th Edition. APHA-AWWA-WPCF, Washington DC. 1000 pp
- Atchison, G. J., Henry, M. G., & Sandheinrich, M. B. (1987). Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of Fishes*, 18(1), 11-25.
- Barcarolli, I. F.; Martinez, C. B. R. (2004). Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(3), 639 – 646.
- Berntssen, M. H. G., Aspholm, O. Ø., Hylland, K., Wendelaar, S. E., & Lundebye, A.-katrine. (2001). Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 299-310.
- Biagini, F. R., de Oliveira David, J. A., & Fontanetti, C. S. (2009). The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. *Micron* (Oxford, England: 1993), 40(8), 839-44.
- Bielmyer, G. K., Gatlin, D., Isely, J. J., Tomasso, J., & Klaine, S. J. (2005). Responses of hybrid striped bass to waterborne and dietary copper in freshwater and saltwater. *Comparative biochemistry and physiology*, 140(1), 131-7.
- Cabral-Pinto, M. M. S., & Silva M. M. V. G. (2005). Contemporary reviews of mine water studies in Europe: Portugal. In C. Wolkersdorfer & R. Bowell (Ed.), *Mine Water and the Environment* (pp. 56-76). New York Springer-Verlag.
- Chowdhury M. J., Pane E. F., Wood C. M. (2004). Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in *Rainbow trout*: respiratory, ionoregulatory, & stress parameters. *Comp Biochem Physiol C* 139:163–173.

- Dautremepuits, C., Betoulle, S., & Vernet, G. (2002). Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio L.*) by *Ptychobothrium sp.* (Cestoda). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573(1), 4-8.
- Depledge, M. H., Amaral-Mendes, J. J., Daniel, B., Halbrook, R. S., Kloepper-Sams, P., Moore, M.N & Peakall, D.B. (1993). The conceptual basis of the biomarker approach. *In: Peakall, D. e Shugart, L.R. (Eds), Biomarkers*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 15-29.
- Drexler, J., Fisher, N., Henningsen, G., Lanno, R., McGeer, J. & Sappington, K. (2003). Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. U.S. EPA Risk Assessment Forum.
- Doadrio, I., Carmona, J. A., & Machordom, A. (2002). Haplotype diversity and phylogenetic relationships among the Iberian barbels (*Barbus, Cyprinidae*) reveal two evolutionary lineages. *The Journal of Heredity*, 93(2), 140-7.
- Eastwood, S., & Couture, P. (2002). Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquatic Toxicology*, 58(1-2), 43-56.
- Evans, D.H., Claiborne, J. B., Farmer, L., Mallery, C., Krasny, E. J. (1982). Fish gill ionic transport : methods and models. *Biological Bulletin*, 163, 108-130.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Potts, W. T. W. (1999). Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*, 283(7), 641-652.
- Ezeonyejiaku, C. D., Obiakor, M. O., & Ezenwelu, C. O. (2011). Toxicity of copper Sulphate and Behavioral Locomotor Response of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) and catfish (*Clarias Gariepinus*) Species. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 1(4), 130-134.
- Fernandes, C. (2007). Contaminação da Barrinha de Esmoriz/Lagoa de Paramos por Metais Pesados: Efeitos Bioquímicos e Histológicos em *Liza saliens*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Vila Real.
- Fernandes, C., Fontaínhas-Fernandes, A., Monteiro, S., Salgado, M. A. (2007a). Histopathological Gill Changes in Wild Leaping Grey Mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz- Paramos Coastal Lagoon, Portugal. *Wiley InterScience*, 443-448.
- Fernandes, C., Fontaínhas-Fernandes, A., Peixoto, F., & Salgado, M. A. (2007b). Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 426-31.
- Fernandes, C., Fontaínhas-Fernandes, A., Monteiro, S. M., & Salgado, M. A. (2007c). Changes in plasma electrolytes and Gill Histopathology in wild *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(3), 301-5.

- Fernandes, C., Fontaínhas-Fernandes, A., Cabral, D., & Salgado, M. A. (2008). Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 136 (1-3), 267-275.
- Fernandes, C., M. A. Salgado & A. Fontaínhas-Fernandes. (2008a). Metabolic Mechanisms of Adaptation to Chronic Metal Exposure – A Case Study. *In Heavy Metal Pollution*. Editors: Samuel E. Brown and William C. Welton. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-61668-049-2.
- Fernandes, C., Fontaínhas-Fernandes, A., Coimbra, A., Saavedra, M.J., S. M. A. (2009). Biochemical blood parameters: are they effective biomarkers of monitoring fish condition. Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMEPE) and SECOTOX Conference, 191-196
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontaínhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E., & Reis-Henriques, M. A. (2006). Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(2), 97-103.
- Fishbase. (s/ data). Fishbase: A Global Information System on Fishes: *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864) [www.fishbase.org/Summary/Luciobarbus-bocagei.html](http://www.fishbase.org/Summary/Luciobarbus-bocagei.html) (acedido em 07 de Maio de 2012).
- Fontaínhas-Fernandes, A. (2005). The Use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies, *Revista Portuguesa de Zootecnia*, XII, 67-86.
- Garcia-Santos, S., Fontaínhas-Fernandes, A., Wilson, J. M. (2006). Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.*, 21, 33-46.
- Gundersen, D. T., Miller, R., Mischler, A., Elpers, K., Mims, S. D., Millar, J. G. Blazer, V. (2000). Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordane- contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*.19 (9), 2275-2285.
- Grosell, M., & Wood, C. M. (2002). Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *The Journal of Experimental Biology*, 205(8), 1179-88.
- Grosell, M., Nielsen, C., & Bianchini, A. (2002). Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative biochemistry and physiology*, 133(1-2), 287-303.
- Grosell, M., Wood, C. M., & Walsh, P. J. (2003). Copper homeostasis and toxicity in the elasmobranch Raja erinacea and the teleost Myoxocephalus octodecemspinosus during exposure to elevated water-borne copper. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135, 179-190.

- Handy, R. D., (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Physiol.*, 135: 25-38
- Heath, A. G. (1995). *Water pollution and fish physiology*. Second Ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL USA, 359.
- Howarth, R.S.; Sprague, J.B. (1978). Copper lethality to *Rainbow trout* in water of various hardness and pH. *Water Research*, 12:455-462.
- INAG. (2008). Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segunda a Diretiva Quadro da Água Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola. Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.
- Jeney Z, Valtonen ET, Jeney G, Jokinen E.I. (2002). Effect of pulp and paper mill effluent (BKME) on physiological parameters of roach (*Rutilus rutilus*) infected by the digenean *Rhipidocotyle fennica*. *Folia Parasitol* 49:103–108.
- Karadede, H., & Unlü, E. (2000). Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Chemosphere*, 41(9), 1371-6.
- Lacroix A, Hontela A. (2004). A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquat Toxicol*, 67:13–21.
- Laflamme, J.-S., Couillard, Y., Campbell, P. G. C., & Hontela, A. (2000). Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 57, 1692–1700.
- Laurén, D. J., & McDonald, D. G. (1985). Effects of copper on branchial ionoregulation in the *Rainbow trout*, *Salmo gairdneri* Richardson Modulation by water hardness and pH. *J. Comp. Physiol. B*, 635-644.
- Laurén, D.J., McDonald, D.G. (1987). Acclimation to copper by *Rainbow trout*, *Salmo gairdneri* - Physiology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44, 99–104.
- Lee, R.M., Shelby, D. G., Jezierska, B. (1983). Electrolyte balance and energy mobilization in acid-stressed *Rainbow trout*, *Salmo gairdneri*, and their relation to reproductive success. *Environ. Biol. Fish.*, 8:115-123.
- Li, J. Quabius, S.E., Wendelaar Bonga, S., Flick, G. e Lock, R.A.C. (1998). Effects of water-borne copper on branchial cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.*, 43:1-11.
- Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotch.*, 57: 195-211.

- Mallatt J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can J. Fish Aquat Sci.*, 42: 630–648.
- Martinez, C. B. R., Nagae, M. Y., Zaia, C. T. B. V. e Zaia, D. A. M. (2004). Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64(4):797-807.
- Mazon, A. F., Monteiro, E. A. S, Pinheiro, G. H. D. e Fernandes, M.N. (2002). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian J. Biol.*, 62(4A): 621-631.
- Mayer, F. L.; Versteeg, D. J., McKee, M. J., Folmar, L. C.; Graney, R. L., McCume, D. C., Rattner, B. A. (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. *In*: Huggett, R. J.; Kimerli, R. A.; Mehrle, P. M.; Bergman, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers. Cap 4, p. 155 –196.
- Monteiro, S.M., Mancera, J.M., Fontainhas-Fernandes, A. e Sousa, M. (2005). Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141:375-383.
- Niyogi S, Wood CM. (2004). Kinetic analyses of waterborne Ca and Cd transport and their interactions in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellow perch (*Perca flavescens*), two species differing greatly in acute waterborne Cd sensitivity. *J. Comp. Physiol. B*, 174:243–253.
- Nogueira, M. S. R. (2011). Impactos ambientais em ecossistemas lóticos do Norte de Portugal. Estudo da bio-ecologia e fisiologia de Anodonta anatina (L.) (Bivalvia, Unionidae). Escola Superior Agrária de Bragança - IPB.
- NRC. (1989). Biological Markers in Reproductive Toxicology. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Nzengue, Y., Candéias, S. M., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A., Rachidi, W., & Guiraud, P. (2011). The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(3), 171-80.
- OECD. (1992). Guideline for Testing of Chemicals - Fish, Acute Toxicity Test.
- Oliveira J.M., Santos J.M., Teixeira A., Ferreira M.T., Pinheiro P.J., Geraldês A. & Bochechas J. (2007). Projecto AQUARIPORT: Programa Nacional de Monitorização de Recursos Piscícolas e de Avaliação da Qualidade Ecológica de Rios. Direcção-Geral Recursos Florestais, Lisboa, 96 pp. ISBN 978-972-8097-67-7.
- Overstreet, R. M. (1988). Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. *Aquatic Toxicology*, 11, 213 – 239.

- Pacheco, M.; Santos, M. A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 331 – 347.
- Pagenkopf, R.K. (1983). Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 342–347.
- Peakall, D.W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, 1: 55-60.
- Perry S. F., Laurent P. (1993). Environmental effects on fish gill structure and function. *In: Rankin JC, Jensen FB, editors. Fish Ecophysiology. London: Chapman & Hall. p 231–264.*
- Pelgrom S., Lock R., Balm P., Bonga W. (1997). Calcium fluxes in juvenile tilapia, *Oreochromis mossambicus*, exposed to sublethal waterborne Cd, Cu or mixtures of these metals. *Environ Toxicol Chem* 16:770–774.
- Pinheiro, P. (s/ data). Naturlink - Fichas de Espécies: Barbo-comum, endêmico mas ubíquo. <http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Fichas-de-Especies/content/Barbo-comum-endemico-mas-ubiquo?bl=1> (acedido em 10 de Maio de 2012).
- Pinheiro, P. J., Ferreira, M. T., Santos, J. M., & Albuquerque, A. C. (2000). Utilização de Radio-Telemetria no Estudo de Seleção de Habitat do Barbo comum (*Barbos bocagei*) no Rio Alva. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos 7<sup>o</sup> Congresso de Água.
- Playle, R.C. (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Sci. Total Environ.*, 219: 147-163.
- Pratap H. B, Fu H, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE. (1989). Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels. *Arch Environ Contam Toxicol* 18:568–575.
- Randall, D.; Burggren, W.; French, K. (2000). *Fisiologia Animal: mecanismos e adaptação*. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Rajotte, J., Pyle, G., & Couture, P. (2003). Indicators of chronic metal stress in wild yellow perch from metal-contaminated environments. Conference Presentations, Mining and Environment, 28th Annual Meeting.
- Rebeiro, F., Beldade, R., Dix. M. Bochechas, J. (2007). Carta Piscícola Nacional. Direção Geral de Recursos Florestais-Fluviatilis, Lda. Publicação Electronica (Versão 09/2007).

- Rogers, J. T., Richards, J. G.; Wood, C. M. (2003). Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Aquatic Toxicology*, 64,215-234.
- Saiki, M. K. (1990). Elemental concentrations in fishes from the salton sea, southeastern california. *Water Air Soil Pollut*, 52, 41-56.
- Saiki, M. K., Jennings, M. R., & Brumbaugh, W. G. (1993). Boron, molybdenum, and selenium in aquatic food chains from the lower San Joaquin River and its tributaries, California. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24(3), 307-19.
- Salazar-Lugo, R., Mata, C., Oliveros, A., Rojas, L. M., Lemus, M., & Rojas-Villaruel, E. (2011). Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(3), 490-5.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., & Aït-Aïssa, S. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined *stickleback*: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1), 177-83.
- Santos Oliveira, J. M., Farinha, J., Matos, J. X., Ávila, P., Rosa, C., Canto Machado, J.M., Daniel, F.S., Martins, L., & Machado Leite, M.R. (2002). Diagnóstico ambiental das principais áreas mineiras degradadas do país. *Boletim de Minas, Instituto Geológico e Mineiro*, 39, 67-86.
- Schimidt-Nielsen, K. (2002). *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. São Paulo: Editora Santos, 5ª ed., 611p.
- Schwaiger, J. et al. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, (1),75-86.
- Sprague, J. B. *Aquatic toxicology*. In: Schreck, C. B.; Moyle, P. B. (Ed.). (1990). *Methods for fish biology*. Bethesda: American Fisheries Society. Cap. 15, p. 491-528.
- Stuart, S., Morris, R. (1985). The effects of season and exposure to Reduced pH (abrupt and gradual) on some physiological parameters in brown trout (*Salmo trutta*). *Can. J. Zool.*, 63: 1078-1083.
- Taylor, L. N., McFarlane, W. J., Pyle, G. G., Couture, P. e McDonald, D. G. (2004). Use of performance indicators in evaluating chronic metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.*, 67: 371-385.
- Teh, S. J.; Adams, S. M.; Hinton, D. E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, 37,51 – 70.

- Teixeira A., Cortes R. M. V. & Oliveira D. (2006). Habitat Use by Native and Stocked Trout (*Salmo trutta* L.) In Two Northeast Streams, Portugal. *Bulletin Française de la Pêche et la Pisciculture* 382: 1-18.
- Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E. S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jaritkhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121,307 – 320.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsók, J., & Abrahám, M. (2001). Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128(3), 467-78.
- Vinodhini, R., & Narayanan, M. (2009). Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 33(4), 273-278.
- Wendelaar Bonga, S. E. and Lock, R. A. C. (1992). Toxicants and osmoregulation in fish. *Netherl. J. Zool.*, 42: 478-493.
- Wilson, R. W., & Taylor, E. W. (1993). The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. *Journal of Comparative Physiology B*, 163(1), 38-47.
- Wilson JM, Laurent P. (2002). Fish gill morphology: inside out. *J Exp Zool* 293:192–213.
- Woo, S., Yum, S., Park, H.-S., Lee, T.-K., & Ryu, J.-C. (2009). Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(3), 289-99.
- Wood CM. (1991). Branchial ion and acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. *Physiol Zool*, 64:68–102.