



**Rosa da Conceição  
Figueiredo Machado**

**Efeitos sub-letais em peixes expostos em laboratório  
ao efluente de uma mina de urânio**



**Rosa da Conceição  
Figueiredo Machado**

**Efeitos sub-letais em peixes expostos em laboratório  
ao efluente de uma mina de urânio**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ruth Maria Oliveira Pereira, Investigadora Auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

Dedico este trabalho aos meus filhos, marido e alunos por todo o apoio e incentivo.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves**  
professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes (co-orientador)**  
professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

**Prof. Doutor Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia**  
professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

**Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira (orientadora)**  
investigadora auxiliar do CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), da Universidade de Aveiro

**Doutor Bruno Branco Castro**  
investigador de Pós- Doutoramento do CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Doutora Ruth Pereira, pela pessoa fantástica que é, por todo o seu profissionalismo e sabedoria, pelo apoio científico e incentivo constantes, essenciais para a elaboração da presente dissertação. Muito obrigado por toda a calma e compreensão transmitidas.

Ao Professor Doutor Fernando Gonçalves, não só, pelo apoio logístico e científico, mas também pela amizade e incentivo prestados durante a elaboração da presente dissertação.

Ao Professor Doutor Bruno Nunes, por todas as orientações e saber científico transmitidos essenciais para a elaboração da presente dissertação

Ao Bruno Castro, pela sua disponibilidade e ajuda preciosa sem a qual não teria sido possível cumprir os objectivos práticos deste trabalho. Muito obrigado pelo tempo e por toda a atenção dispensada.

Aos colegas e amigos do laboratório, pelo incentivo, partilha de conhecimento e boa disposição.

Aos meus Amigos e Alunos, pelo seu apoio constante, não me deixando nunca desistir.

Por fim, mas não menos importante, aos meus filhos e marido, muitas vezes privados da minha atenção, mas que, nos momentos mais difíceis, souberam mostrar o seu carinho e compreensão.

## palavras chave

mina de urânio; efluente; metais pesados; pH; *Carassius auratus*; ensaios de toxicidade; mortalidade; bioacumulação de urânio, catalase do músculo; TBARS; comportamento alimentar

## resumo

As minas de minério radioactivo abandonadas geram graves problemas ambientais como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, devido à produção de efluentes ácidos ricos em metais e radionuclídeos. A utilização indevida destas águas contaminadas ou escorrências acidentais acarretam graves riscos para a saúde das populações humanas vizinhas e para a sustentabilidade dos ecossistemas de água doce. No âmbito de uma análise de risco em curso, e de forma a complementar a informação ecotoxicológica já disponível para o efluente de uma mina de urânio abandonada (Cunha Baixa, Mangualde, Centro de Portugal), para diversas espécies de água doce, efectuou-se um ensaio ecotoxicológico com *Carassius auratus*, de forma a determinar a toxicidade aguda deste efluente. Assim os valores de  $CE_{50}$  (concentração efectiva que causa a morte de 50% dos organismos testados) para *Carassius auratus* foram  $EC_{50-24h} = 82,90\%$  ( $IC_{95\%} = 75,2- 94,8$ );  $EC_{50-48h} = 78,20\%$  ( $IC_{95\%} = 78,2- 86,2$ ) e  $EC_{50-96h} = 76,6\%$  ( $IC_{95\%} = 75,9- 77,3$ ). De forma a avaliar o papel da acidez do efluente na mortalidade dos organismos, estes foram expostos ao efluente não diluído, com pH ajustado para um valor próximo da neutralidade, durante 24h. Após este período de exposição não houve registo de mortalidade, pelo que se pode concluir que a acidez tem um papel preponderante na toxicidade aguda do efluente. Sendo o urânio um dos elementos de maior preocupação neste tipo de efluentes, foi realizado um teste ecotoxicológico com *Carassius auratus*, expondo os organismos a concentrações sub-letais de nitrato de urânio, durante 96h, para avaliar a bioacumulação de urânio no músculo e o efeito do ião urânio em parâmetros sub-letais como o comportamento alimentar, a actividade da enzima catalase hepática e a peroxidação lipídica das células hepáticas, através da medição dos níveis de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estes mesmos parâmetros foram ainda avaliados 48 e 96h após a exposição ter terminado. A espécie *Carassius auratus* demonstrou ser capaz de bioacumular urânio no músculo, quando exposta a concentrações de urânio relativamente elevadas ( $450$  e  $2025 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Da mesma forma estes organismos são capazes de eliminar o urânio deste tecido, para níveis equivalentes aos do controlo, após 48h de pós-exposição. Não obstante tal facto, o comportamento alimentar dos peixes parece não ter sido afectado, na medida em que a proporção de presas ingeridas aumentou significativamente, relativamente ao controlo, ao longo do tempo ( $P < 0,05$ ). Contudo, o factor concentração não teve qualquer efeito significativo neste aumento. Não foi possível dosar a actividade da enzima catalase nos organismos expostos à concentração mais elevada de nitrato de urânio; este parâmetro não sofreu alterações no período de pós-exposição. Tal facto pode ter resultado, da inibição directa desta enzima, por ligação do urânio a grupos  $-SH$  da proteína. Contudo, a inibição desta enzima, não resultou num dano oxidativo mais agravado das células hepáticas, na medida em que não se observaram diferenças significativas nos níveis de TBARS, registados nos organismos expostos às diferentes concentrações da solução de nitrato de urânio. Recomenda-se a avaliação destes parâmetros, conjugados com parâmetros de genotoxicidade, para períodos de exposição mais longos.



## keywords

uranium mine effluent; pH; metals; toxicity assays; *Carassius auratus*; mortality; uranium bioaccumulation; muscle; catalase activity; TBARS; feeding inhibition

## abstract

Radioactive ore abandoned mines generate serious environmental problems such as the contamination of surface and groundwater resources, due to the production of an acid mine drainage rich in metals and radionuclides. Misuse of contaminated water or accidental surface runoffs poses serious risks to the health of local population and to the sustainability of freshwater ecosystems. Hence, as part of the Ecological Risk Assessment (ERA) that is being carried out for Cunha Baixa uranium mine (Mangualde, Centro de Portugal), to complement the ecotoxicological information, already available for different freshwater species (e.g. algae and invertebrates), for the mine effluent, an acute ecotoxicological assay with *Carassius auratus* was performed in this study. Thus the EC<sub>50</sub> concentrations (effective concentrations that are responsible by the mortality of 50% of tested organisms) recorded for *Carassius auratus* were: CE<sub>50-24h</sub> = 82,90% (IC<sub>95%</sub> = 75,2- 94,8); CE<sub>50-48h</sub> = 78,20% (IC<sub>95%</sub> = 78,2- 86,2) and CE<sub>50-96h</sub> = 76,6% (IC<sub>95%</sub> = 75,9- 77,3). Furthermore, in order to assess the role of effluent acidity in fish mortality, the organisms were exposed to the effluent, with pH adjusted to neutrality, for 24H. No mortality was recorded after this exposure period, suggesting that the acidic pH has a crucial role in the acute toxicity of the effluent. Since uranium is a highly concerning element in this kind of effluents, a ecotoxicological test with *Carassius auratus* was performed, in which organisms were exposed to sub-lethal concentrations of uranyl nitrate, for 96 hours. The bioaccumulation of uranium in the muscle and the effect of this element in the activity of liver catalase and in lipid peroxidation of hepatic cells, by measuring of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were the parameters assessed. Moreover, in order to evaluate the ability of fish to recover from these sub-lethal effects, the same parameters were evaluated 48 and 96h after the exposure has ceased. *Carassius auratus* showed the ability to significantly bioaccumulate uranium, in the muscle, when exposed to the highest concentrations of uranyl nitrate tested (450 and 2025 μg L<sup>-1</sup>). Fish were also able to depurate uranium from this tissue, after 48h of post-exposure. Despite the internalization of uranium the feeding behaviour was not significantly affected. Animals showed a significant increase in the proportion of preys consumed, when compared with animals from the control, with increasing post-exposure period. Nevertheless, a no significant effect of concentrations was recorded. It was not possible to quantify the activity of catalase, in the liver of fish exposed to the highest uranyl nitrate concentration (2025 μg L<sup>-1</sup>). The same fact persists during the post-exposure period. These results may be explained by direct inhibition of catalase due to the ability of uranium to link to groups -SH from proteins. However, this inhibition do not result in more pronounced oxidative stress effects because no significant differences, in the levels of TBARS, were recorded among animals exposed to different test concentrations and those from the control. We recommend the evaluation of these parameters in parallel with other aimed in evaluating genotoxic effects for long exposure periods.







## Índice

### Introdução Geral

1.1. Biomarcadores	2
1.2. Os peixes como organismos teste	3
1.3. Os metais	5
1.4. A mina de urânio da Cunha Baixa	6
1.5. Objectivos e Estrutura da dissertação	9
Bibliografia	11

### Capítulo I 21

#### **Avaliação da toxicidade aguda do efluente de uma mina de urânio abandonada (Mina da Cunha Baixa, Mangualde) para a espécie piscícola *Carassius auratus* (L.1758)**

Resumo	21
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	26
3. Resultados	31
4. Discussão	34
5. Conclusão	38
Bibliografia	40

### Capítulo II 50

#### **Avaliação da bioacumulação e da toxicidade sub-letal do urânio em *Carassius auratus* (L. 1758) (comportamento alimentar, e biomarcadores de stress oxidativo)**

Resumo	50
1. Introdução	52
2. Material e Métodos	54
3. Resultados	58
4. Discussão	60
5. Conclusão	63
Bibliografia	65

### Conclusão Geral 72

Bibliografia	74
--------------	----







## 1. Introdução Geral

Os sistemas aquáticos são entendidos, sem paradoxos, como os principais receptores de inúmeros poluentes, pois para além das descargas directas, são ainda alvo da contaminação resultante da deposição atmosférica e lixiviação do solo (Pacheco, 1999). Estes sistemas têm sido sujeitos a pressões crescentes, à medida que as descargas de efluentes aumentam e que os fluxos de água são alterados. Inevitavelmente a disponibilidade de água doce tem diminuído concomitantemente com o aumento da poluição deste recurso. Assim, independentemente da sua origem, o meio aquático é o depósito de uma grande variedade de produtos químicos (Long e Buchman, 1990; Mackay *et al.*, 1992; Mackay *et al.*, 1992b; Tanabe *et al.*, 2004), as perturbações resultantes no biota aquático surgem após a exposição aguda a misturas complexas de contaminantes ou devido a períodos de exposição crónica (Hopkins *et al.* 2004; Klerks, 1999; Long e Buchman, 1990; Moore, 2002). Com o objectivo de perceber tais perturbações a Ecotoxicologia Aquática tem vindo a desenvolver e a padronizar, desde os anos 80, baterias de testes/ensaios laboratoriais com organismos de diferentes espécies e de diferentes níveis tróficos. Os testes de toxicidade, através de exposições em condições controladas, a concentrações definidas e mensuráveis de compostos individuais permitem a determinação de curvas dose – resposta, fundamentais para prever a incidência de efeitos ao nível individual ou sub-individual (Goyer e Clarkson, 2001). Os dados de toxicidade obtidos para as diferentes espécies, e para os diferentes parâmetros avaliados, podem subsequentemente ser integrados e utilizados no cálculo de valores de referência para os diferentes contaminantes, como as concentrações que previsivelmente não produzem efeitos (do Inglês: *Predicted no Effect Concentrations* -PNEC), para os organismos aquáticos. Estes valores extrapolados pressupõem a protecção, não apenas de espécies individuais, mas de todo o ecossistema e, são de grande utilidade, numa Análise de Risco Ecológico (ARE), sobretudo nas etapas iniciais, para se comparar com as concentrações que se prevê que possam a vir estar presentes no meio ambiente (do Inglês: *Predicted environmental concentration* - PEC) ou com as concentrações que se podem registar num local já contaminado, fazendo desta forma uma avaliação preliminar dos riscos (USEPA, 1998; Weeks and Comber, 2005). Contudo, o grau de incerteza associado a este tipo de avaliação, baseada na comparação com valores de referência, é geralmente elevado por

diversos motivos, nomeadamente pelo facto de: i) estes valores se basearem em testes efectuados com um número reduzido de espécies; ii) as espécies utilizadas em laboratório serem diferentes das que estão presentes nos ecossistemas potencialmente em risco e ainda, este tipo de avaliação não ter em conta as interações entre as espécies e o papel dos factores abióticos na mobilização, biodisponibilidade e impacto dos contaminantes. Em suma, subsiste o problema da biocomplexidade existente nos níveis de organização biológica mais elevados (Hinton et al., 2005). Pelo que se torna pertinente que as respostas individuais e sub-individuais aos contaminantes (que são muito sensíveis e passíveis de serem quantificadas após um curto período de exposição) sejam integradas com avaliações dos efeitos nas populações, comunidades e ecossistema (Burton, 1991; Peakall, 1992). Isto porque as variáveis de reduzida complexidade biológica são mais sensíveis do que as alterações ao nível das populações ou comunidades, contudo as últimas são mais protectoras dos ecossistemas e permitem fazer previsões com alguma segurança. Não obstante este facto, os efeitos observados a um baixo nível de organização biológica poderão ainda não ser detectáveis ao nível das populações ou da comunidade, pelo que apesar da sua reduzida relevância ecológica se tornam excelentes sinais de alerta precoces de perturbações (Castro et al., 2004; Jensen et al., 1997; Newman, 1998).

### **1.1. Biomarcadores**

Para detectarmos as respostas fisiológicas e bioquímicas dos organismos expostos a contaminantes, o uso de biomarcadores moleculares apresenta vantagens, na medida estes são geralmente parâmetros sensíveis ao nível sub-individual (Jensen et al., 1997); facilmente mensuráveis; que permitem detectar precocemente, os efeitos adversos que se farão sentir a níveis mais elevados de complexidade. Adicionalmente a avaliação de grande parte dos biomarcadores é de aplicação rápida, de baixo custo e passível de ser aplicada a um número abrangente de espécies e a um número elevado de indivíduos (Newman, 1998). Assim, a utilização de biomarcadores, quer para monitorização da qualidade ambiental, quer para a obtenção de informação relativa à condição dos organismos que se encontram em ecossistemas poluídos, tem recebido crescente atenção nos últimos anos (Lopes et al., 2001; Lionetto et al., 2003; Ozmen et al., 2006; de la Torre et al., 2007).

Entre as várias definições de biomarcador salientamos a de Timbrell, 1998, que o



define como todas as *alterações bioquímicas, histológicas ou fisiológicas induzidas por contaminantes e que podem ser mensuráveis num sistema ou amostra biológica*. Do ponto de vista bioquímico, podemos falar de biomarcadores de neurotoxicidade (e.g. actividade da enzima acetilcolinesterase), que reflectem efeitos adversos na estrutura ou função do sistema nervoso central e/ou periférico, por força de agente biológico, químico ou físico (Slikker et al., 2005); biomarcadores de proliferação peroxissomal/stress oxidativo (e.g. actividade de enzima catalase, TBARS), relacionados com diversas patologias ligadas ao stress oxidativo; biomarcadores de metabolismo de destoxificação por conjugação com glutathione nos processos de fase II (e.g. actividade das glutathione-S-transferases), responsáveis pela biotransformação de substâncias potencialmente nocivas, em substâncias de elevada solubilidade em água, e regra geral, mais baixa toxicidade; biomarcadores respiratórios (e.g. a actividade da enzima lactato-desidrogenase), cuja actividade permite avaliar o estado metabólico dos organismos, no que diz respeito ao predomínio do metabolismo anaeróbio sobre o aeróbio. Na escolha de um biomarcador deve ter-se em consideração as características do organismo, as condições ambientais em teste, a resposta esperada em função do mecanismo de acção do(s) tóxicos a que os organismos estão expostos, a via de exposição e a duração da exposição.

## **1.2. Os peixes como organismos teste**

Os organismos aquáticos são alvos preferenciais da contaminação aquática. A bioacumulação de contaminantes nos seus tecidos e órgãos tem sido objecto de estudo, por todo o mundo, sendo considerados óptimos indicadores da avaliação e monitorização da qualidade ambiental (e.g. Yarsan et al, 2007; Henry et al., 2004). Tendo em conta as suas características fisiológicas, os peixes têm a capacidade de desencadear mecanismos adaptativos que se baseiam na manutenção do equilíbrio do meio interno – dependentes de um controlo homeostático manifestamente coordenado – que lhes permite sobreviver, crescer e reproduzir (Pacheco, 1999). Este autor refere, ainda, que esta adaptabilidade assenta numa complexa rede de respostas, como as alterações hormonais, fisiológicas ou metabólicas, que podem constituir excelentes indicadores da interacção do organismos com o(s) agente(s) químico(s) que, directa ou indirectamente, afectam a qualidade ambiental. Estudos recentes (e.g. Alibabić et al., 2007; Smith et al., 2006; Papagiannis et

al., 2004; Rashed et al., 2001) demonstraram ainda que os peixes são organismos sensíveis, capazes de fornecerem inúmeras informações relativamente à presença de substâncias tóxicas na água, estando particularmente bem documentada a toxicidade provocada pelos metais (e.g. Delistraty et al., 2007; Fernandes et al., 2007; Petrlova et al., 2007). Foi já levado a cabo um número considerável de estudos em peixes da espécie *Carassius auratus*, dedicados a aspectos como as respostas a agentes tóxicos e de *stress* (e.g. Sharifi et al., 1997; Mimeault et al., 2006), mecanismos de recuperação de alterações nutricionais (e.g. Kestemont, 1995; Volkoff et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 2005), ou ainda, alterações citogenéticas (e.g. Luo et al., 2006; Wang et al., 2007a).

Tendo em conta que o sistema enzimático antioxidante se encontra virtualmente presente em todos os tecidos de vertebrados (mostrando geralmente, maior actividade no fígado, o maior órgão de biotransformação de xenobióticos; Zakharov e Clarke, 1993; Lemaire et al., 1994), torna-se importante fazer a sua avaliação integrada pois alterações neste sistema sinalizam modificações fisiológicas de cariz oxidativo. As enzimas como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e a superóxido dismutase (SOD) são considerados bons indicadores, não só para a determinação de stress oxidativo, como também para indicar a grandeza da resposta de populações, cronicamente expostas a contaminantes, como metais e outros xenobióticos (Livingstone et al., 1994; Gamble et al., 1995; Regoli et al., 1998).

Ao longo dos últimos anos, pequenos peixes de aquário, como *Poecilia reticulata*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinodon variegatus* e *Carassius auratus*, foram utilizados, no laboratório, como modelos que permitissem estabelecer os mecanismos de actuação das substâncias tóxicas, quer pela sensibilidade demonstradas, quer pela facilidade de obtenção e manutenção, e finalmente pela sua posição nas cadeias alimentares. (Hinton et al. 2005). *Carassius auratus* (nome comum, pimpão), é uma espécie pertencente à família *Cyprinidae*, frequente nas águas dos rios do Centro do País, que pela sua posição intermédia nas cadeias alimentares, poderá ter um papel importante no equilíbrio dos Ecossistemas. A sua exposição a metais pesados desencadeia processos de bioacumulação sobretudo no fígado, músculo e guelras, (Zhang et al., 2005; Bagnyukova et al., 2007). Rayment e Barry (2000) explicam esta preferência remetendo para a acessibilidade destes organismos (quer na natureza em estado selvagem, quer em aquacultura), a simples, rápida e económica preparação e análise das amostras,

relativamente aos demais métodos alternativos utilizados na investigação da toxicidade em água e sedimentos.

### **1.3. Os metais**

O impacto dos metais nos ecossistemas tem sido avaliada medindo os seus níveis no ar, água e no solo, e deduzindo os seus potenciais efeitos sobre os organismos. Têm sido levados a cabo vários ensaios laboratoriais para avaliar os efeitos de doses específicas, de metais individuais (Poston, 1982; Gill et al., 1991, 1992; Labrot et al., 1999; McGeer et al., 2000a e 2000b) ou de misturas (Lange et al., 2002; Fleeger et al.2007; Kazlauskienė e Vosyliene, 2008) sobre os organismos. Estes trabalhos, bem como determinações *in situ*, e a consequente avaliação dos efeitos, permitiram concluir que os mesmos não se devem exclusivamente à concentração do metal, mas a um vasto leque de outros factores intrínsecos (e.g. a idade, sexo, tamanho e sensibilidade das espécie e a sua posição na cadeia alimentar) ou extrínsecos aos organismos (e.g. a matéria orgânica dissolvida, o pH, a dureza da água, a temperatura, a salinidade) que alteram a sua biodisponibilidade (Riethmuller et al., 2001; Luoma e Rainbow, 2005; Bagnyukova et al., 2007).

Daí que os métodos para medir e avaliar os efeitos dos metais no ambiente são bastante complexos, não só pela variável sensibilidade dos organismos, como também pela necessidade de ferramentas sensíveis, necessárias à detecção dos seus limites, e ainda devido à interacção dos próprios metais uns com os outros (Heath, 1995). Peakall e Burger (2003) analisaram os efeitos dos metais individualmente, em diferentes organismos, assim como o papel de factores ambientais (como o pH e a salinidade) na sua biodisponibilidade, tendo verificado que alguns factores aumentam a absorção do metal, enquanto que outros a diminuem. Uns apresentam grandes efeitos nos invertebrados, enquanto que outros afectam mais significativamente os vertebrados. Os peixes foram considerados, nesse trabalho, como espécies “sentinela” e bioindicadores muito úteis para a compreensão do risco, nos próprios organismos, no ecossistema e até na saúde Humana.

Na actualidade os níveis de metais pesados, em muitas massas de água, superficiais e subterrâneas, foram considerados como um elevado risco para a vida aquática e até para a saúde Humana. Nestes sistemas e tal como foi mencionado, anteriormente, a origem desses metais pode ser diversa, incluindo a contaminação por efluentes ácidos de minas (do Inglês: *acid mine drainage-AMD*). Entre os diferentes metais presentes nos efluentes

ácidos de explorações de minério radioactivo, o urânio é um elemento de grande preocupação não só pela sua toxicidade química como pela radiológica (Sheppard et al., 2005). O urânio é um elemento radioactivo de ocorrência natural, que devido à sua instabilidade rapidamente decai para outros elementos, igualmente tóxicos (radão, chumbo, polónio e bismuto). Alguns autores (Franklin et al. 2000, Charles et al. 2002, Hogan et al. 2005), têm obtido informação acerca dos factores que influenciam a toxicidade do ião uranilo ( $U_{VI}UO_2^{2+}$ ), em meio aquático como o pH e dureza. Segundo estes, a diminuição da toxicidade do urânio varia inversamente com a diminuição do pH e directamente com o aumento da dureza da água, provavelmente devido à redução da entrada de  $UO_2^{2+}$  nas membranas das células e/ou devido à competição com outros iões positivos, com maior afinidade para os canais iónicos (Riethmuller et al. 2001). A formação dos complexos de urânio, com ligandos inorgânicos (carbonatos, fosfatos ou iões hidroxilo) também diminui a toxicidade, devido à redução da sua biodisponibilidade. (Fortin et al. 2004).

Existe pouca informação acerca da toxicidade do urânio, para os organismos aquáticos. Sheppard et al. (2005) apresenta uma revisão da literatura disponível relacionada com a avaliação ecotoxicológica deste elemento para organismos de diferentes níveis tróficos. De acordo com a dose, via de administração e forma química dos compostos de U, são produzidos diferentes efeitos, nas diferentes espécies, e em diferentes órgãos. Os compostos solúveis mostraram ser mais perigosos que os não solúveis. Nos estudos apresentados verificou-se uma boa relação entre o efeito da concentração de urânio e a dureza da água, aumentando os valores de PNECs (predicted no-effect concentrations) com a dureza da água..

#### **1.4. A mina de urânio da Cunha Baixa**

A exploração de urânio, em Portugal, decorreu ao longo de quase um século, tendo terminado no final do Século XX, num total de cerca de 60 locais, localizados principalmente nos distritos de Viseu e Guarda. (ver fig. 1) Desta actividade estima-se que cerca de 13 milhões de toneladas de resíduos sólidos foram armazenadas em solos perto das áreas mineiras (Carvalho et al., 2003)

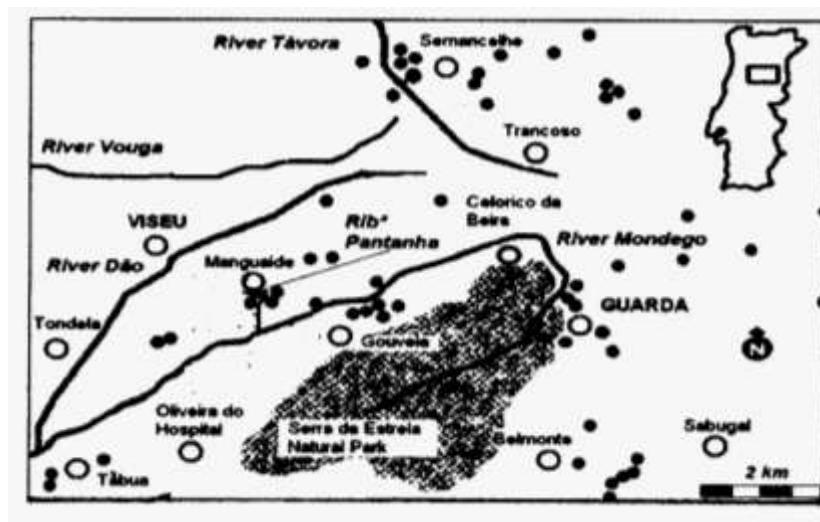


Figura 1. Localização das principais minas de urânio em Portugal. (adaptado de Carvalho et al. 2007).

A mina de urânio da Cunha Baixa situa-se na "região uranífera das Beiras", no concelho de Mangualde, distrito de Viseu, pertencendo ao mesmo complexo mineiro da Urgeiriça, do qual fizeram parte as explorações de urânio mais importantes em Portugal. A mina da Cunha Baixa, esteve em laboração entre 1967 e 1993, sob a tutela da Junta de Energia Nuclear (JEN), passando posteriormente para a responsabilidade da Empresa Nacional de Urânio (ENU). Mais tarde a concessão foi depois transferida para a EXMIN - Companhia de Indústria e Serviços Mineiros e Ambientais, recentemente denominada EDM -Empresa de Desenvolvimento Mineiro, a qual assumiu a responsabilidade da requalificação ambiental das áreas mineiras abandonadas, imposta pelo Dec.-Lei nº 198-A, 2001, de 6 de Julho (ME, 2001).

A exploração de minério na Cunha Baixa foi primeiramente efectuada por lavra subterrânea (1967 a 1987), a qual atingiu uma profundidade máxima de 150m sendo, no final da exploração (1984 a 1991), substituída por lavra de céu aberto (Santos Oliveira e Ávila, 2001). Este método de exploração foi acompanhado por processos de lixiviação estática, *in situ*, com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), de modo a recuperar uma maior quantidade possível de óxidos de urânio a partir do minério de baixos teores (Santos Oliveira e Ávila, 2001; Pedrosa e Martins, 1999). Neste processo, os licores da lixiviação eram recolhidos e posteriormente levados para o complexo principal (Urgeiriça) para se proceder à sua industrialização (Santo e Freire, 1983). Como resultado da exploração da mina da Cunha

Baixa foram extraídas cerca de 500 000 toneladas de minério e 76 000 kg de óxidos de urânio ( $U_3O_8$ ) provenientes das operações de lixiviação "*in situ*". Como resultado de toda a actividade mineira, foram então produzidas cerca de 1,1 milhões de toneladas de minério pobre e escórias que foram utilizadas para encher os túneis de lavra subterrânea e do céu aberto. Os restantes depósitos de escórias foram deixados em escombreiras nas imediações da exploração mineira (Santos Oliveira e Ávila, 2001; Neves et al., 1997). Esta intensa e prolongada actividade gerou um enorme problema ambiental. Os resíduos da actividade mineira contaminaram com radionuclídeos, urânio e outros metais, uma extensa área de terrenos agrícolas, a jusante da mina, que são cultivados pelas populações ao longo de uma linha de água, que se estende desde a mina até ao Rio Castelo, que desagua no rio Mondego. Adicionalmente, e ainda como resultado do processo de lixiviação ácida *in situ*, os rios da região, em particular o rio Castelo, foram igualmente expostos a estes contaminantes, em função da produção de uma drenagem ácida, nos túneis subterrâneos da exploração. Carvalho et al. (2007) encontrou valores elevados de radionuclídeos, em amostras de sedimento dos quatro principais rios da região centro do país, nomeadamente o Mondego, Dão, Vouga e Távora, e num pequeno riacho que passa pela zona mineira da Urgeiriça, a Ribeira da Pantanha, que desagua na secção média do rio Mondego, onde se encontraram as concentração de radionuclídeos mais elevadas.

Actualmente, os potenciais riscos/perigos destes locais foram já reconhecidos pelas entidades responsáveis (Santos Oliveira e Ávila, 2001). Contudo, a reabilitação adequada e economicamente viável das áreas mineiras só é possível se tiver por base uma avaliação efectiva dos riscos ecológicos que permita tomar decisões acertadas sobre: i) as áreas a requerer uma intervenção prioritária, a remoção ou não dos resíduos, a possível reflorestação da zona, e a adequação dos tratamentos a efectuar às águas residuais, de modo a reduzir o seu impacto nos meios receptores. Contudo, o processo de análise de risco de locais contaminados em contexto nacional é dificultado, na sua fase inicial pela falta de legislação Portuguesa, que estabeleça os valores de qualidade adequados, para águas superficiais e solos. Esta lacuna é geralmente compensada com a realização de ensaios ecotoxicológicos, com uma bateria de espécies padronizadas e autóctones, que representem ao máximo possível, os diferentes níveis tróficos dos sistemas aquático e terrestres, as diferentes sensibilidades, e as espécies de maior interesse económico regional. Assim, e com este propósito, está em curso, para a área mineira da Cunha Baixa, uma

análise de risco ecológico baseada no esquema Inglês e Holandês de análise de risco para locais contaminados. No âmbito da primeira estapa desta análise, Antunes et al., (2007a) e Marques et al. (2008) registaram a presença de elevadas concentrações de metais (e.g. U, Al, Mn, Zn, Sr) e de compostos inorgânicos, que afectam a sua biodisponibilidade e toxicidade, no efluente mineiro da Cunha Baixa. Os mesmos autores registaram ainda níveis de acidez (3,5-4,5) e valores de condutividade muito elevados (1005  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Adicionalmente a esta caracterização química, foram realizados ensaios ecotoxicológicos ao efluente mineiro e águas residuais de outras lagoas integradas no sistema aquático da mina, em laboratório, com uma bateria de espécies de água doce, nomeadamente microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), cladóceros (*Daphnia magna* e *D. longispina*) e com ovos e larvas de rã-verde (*Rana perezi*), que demonstraram a toxicidade aguda e sub-letal do efluente (Antunes et al., 2007a, 2007b; Marques et al., 2008). Adicionalmente, registaram-se ainda alterações histopatológicas e anomalias nucleares eritrocíticas em adultos de rã-verde residentes nas lagoas com efluente mineiro (Marques et al., *in press*). A toxicidade aguda do efluente da mina da Cunha Baixa para peixes foi igualmente demonstrada num ensaio *in situ*, durante o qual peixes da espécie *Carassius auratus* morreram poucas horas após exposição ao efluente (Bessa et al, *submitted*). Neste ensaio *in situ* (Bessa et al, *submitted*) demonstrou ainda a toxicidade sub-letal do efluente mineiro, mesmo após tratamento químico. Contudo, e dada a toxicidade aguda do efluente, para percebermos melhor os riscos associados a uma descarga acidental do mesmo nos cursos de água locais, é necessário complementar a informação já existente, com uma avaliação da sua toxicidade para peixes, expostos em laboratório, a uma gama de diluições dos efluentes.

### **1.5. Objectivos e Estrutura da Dissertação**

O presente trabalho, integrado na avaliação de risco ecológico, em curso para a mina de urânio da Cunha Baixa, teve como objectivos:

- 1) Obter informação sobre a toxicidade aguda do efluente mineiro para peixes de água doce, através da exposição de organismos da espécie *Carassius auratus*, durante 96h, em condições laboratoriais, controladas para determinação de valores de  $\text{EC}_{50}$ .

2) Discernir o papel do pH, do dos metais, na produção de efeitos tóxicos agudos em *Carassius auratus*, o que foi conseguido através de um ensaio preliminar ao efluente após ajuste de pH para valores próximos da neutralidade.

3) Avaliar os efeitos tóxicos sub-letais do urânio, um dos elementos químicos de maior preocupação, no efluente da mina da Cunha Baixa, e a recuperação dos mesmos, em peixes da espécie *Carassius auratus*, através da exposição laboratorial a uma gama de concentrações de nitrato de urânio, durante 96h e da avaliação de parâmetros individuais e sub-individuais (inibição alimentar, bioacumulação de urânio no músculo e biomarcadores de stress e dano oxidativo).

A estrutura da tese obedece, portanto, a uma Introdução Geral, onde se aborda a problemática da contaminação mineira de sistemas aquáticos e as ferramentas disponíveis para a sua avaliação. Esta é seguida de dois capítulos, redigidos em formato de artigo científico, seguidos pela Conclusão Geral que pretende integrar toda a informação gerada nos dois capítulos.



---

**Bibliografia**

- Alibabić, V., Vahčić, N., Bajramović, M. (2007). Bioaccumulation of metals in fish of salmonidae family and the impact on fish meat quality. *Environmental Monitoring and Assessment* 131:349–364.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F. (2007a). Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 53:207–213.
- Antunes, S.C., de Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F. (2007b). Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of Total Environment* 374:252–259.
- Bandyopadhyay, P., Swain, S.K., Mishra, S. (2005). Growth and dietary utilisation in goldfish (*Carassius auratus* Linn.) fed diets formulated with various local agro-produces. *Bioresource Technology* 96:731–740.
- Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P. e Lushchak, V.I. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 658-665
- Burton, G.A., Jr. (1991). Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10:1585–1627
- Carvalho, F.P. (2003). Environmental remediation of old uranium mining sites and radiological protection goals. *Radioprotecção II* (3):159–165.
- Carvalho, F.P., Madruga M.J., Reis, M.C., Alves J.G., Oliveira J.M., Gouveia J. e Silva L. (2007). Radioactivity in the environment around past radium and uranium mining sites of Portugal. *Journal of Environmental Radioactivity* 96(1-3):39-46.
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L., Ribeiro, R. (2004). An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13(7): 667-681.
- Charles, Al., Markich, S.J., Stauber, J.L. e de Filippis, L.F. (2002). The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chorella* sp.) *Aquatic Toxicology* 60:61-73.
- de la Torre, F. R., Salibián A., e Ferrari, L. (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68:1582–1590.

- Delistraty, D., Stone, A. (2007). Dioxins, metals, and fish toxicity in ash residue from space heaters burning used motor oil. *Chemosphere* 68(5): 907–914.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Salgado, M.A. (2007). Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz–Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66:426–431.
- Fleeger, J.W., Gust, K.A., Marlborough, S.J., Tita, G. (2007). Mixtures of metals and polynuclear aromatic hydrocarbons elicit complex, nonadditive toxicological interactions in meiobenthic copepods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(8): 1677-1685.
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J. (2004). Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 974-981.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Markich, S.J., Lim, R.P. (2000). pH- dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology* 48: 275-289.
- Gamble, S.C., Goldfarb, P.S., Porte, C., Livingstone, D.R. (1995). Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Marine Environmental Research* 39: 191–195.
- Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J. (1991). *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* Ham.(rosy barb). *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C: 501-505.
- Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J. (1992). Short- and long-term effects of copper on the rosy barb (*Puntius conchoni* Ham.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 23: 294-306.
- Henry, F., Amara, R., Courcot, L., Lacouture, D., Bertho, M.-L. (2004). Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environment International* 30: 675–683.
- Heath, A.G. (1995). *Water pollution and fish physiology* – 2nd Edition. CRC Press, Inc., USA.

- Hinton, D.E., Kullman, S.W., Hardman, R.C., Volz, D.C., Chen, P.J., Carney, M., Bencic, D.C. (2005). Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12): 635-648
- Hogan, A.C., van Dam, R.A., Markich, S.J., Camilleri, C. (2005). Chronic toxicity of uranium to a tropical green alga (*Chlorella* sp.) in natural waters and the influence of dissolved organic carbon. *Aquatic Toxicology* 75: 343-353.
- Hopkins, F.E., Mudge, S.M. (2004). Detecting anthropogenic stress in an ecosystem: 2. Macrofauna in a sewage gradient. *Environmental Forensics* 5(4): 213-223
- Jensen, C.S., Garsda, L., Baatrup, E. (1997). Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1727-1732.
- Kazlauskienė, N. e Vosyliene, M.Z. (2008). Characteristic features of the effect of Cu and Zn mixtures on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in ontogenesis. *Polish Journal of Environmental Studies* 17 (2): 291-293
- Kestemont, P. (1995). Influence of feed supply, temperature and body size on the growth of goldfish *Carassius auratus* larvae. *Aquaculture* 136: 341–349
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W. (2001). Toxic effects of metals. In Casarett & Doull's pp 578,579
- Klerks, P.L. (1999). The influence of contamination complexity on adaptation to environmental contaminants. *Genetics and Ecotoxicology*, V.E. Forbes, Philadelphia Cap.6, pp. 103–121.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Saint Denis, M. e Ribera, D. (1999). Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36(2): 167-178.
- Lange, A., Ausseil, O., Segner, H. (2002). Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C-Toxicology & Pharmacology* 131(3): 231-243
- Lemaire, P., Matthews, A., Forlin, L., Livingstone, D.R. (1994). Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca*

- fluvialis*) by model and pollutant xenobiotics. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 26: 191–200.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin 46: 324–330.
- Livingstone, D.R., Forlin, L., George, S.G. (1994). Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. In: Sutcliffe, D.W. (Ed.), Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Ecosystems: Linkind Levels of Organisation (Individuals, Populations, Communities). Freshwater Biological Association, England, pp. 154–171.
- Long, E.R. e Buchman, M.F. (1990). A comparative evaluation of selected measures of biological effects of exposure of marine oragnisms to toxic chemicals. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), Biomarkers of Environmental Contamination. Boca Raton, pp. 355–394.
- Lopes, I., Gonçalves, F., Soares, AM.V.M. Ribeiro, R. (1999). Discriminating the ecotoxicity due to metals and to low pH in acid mine drainage. Ecotoxicology and Environmental Safety 44:207-214.
- Lopes, P. A., Pinheiro, T., Santos, M. C., Mathias, M, L., Collares-Pereira, M. J., Viegas-Crespo, A. M. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. Science of Total Environment 280: 153–163.
- Luo, J., Lang, M., Salzburger, W., Siegel, N., Stölting, K. N., and Meyer, A. (2006). A BAC Library for the Goldfish *Carassius auratus auratus* (Cyprinidae, Cypriniformes). Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.) 306B: 567–574.
- Luoma, S.N. e Rainbow, P.S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science & Technology 39(7): 1921-1931
- MA, 1998. Decreto-lei nº236/98, 1 de Agosto. Ministério do Ambiente. Diário de República nº 176/98 Série I-A: 3676-2722 (disponível em <http://dre.pt>).

- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C. (1992a). Illustrated handbook of physical–chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Vol. I: Monoaromatic Hydrocarbons, Chlorobenzenes, and PCBs. Boca Raton, FL.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C. (1992b). Illustrated handbook of physical–chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume II: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins, and Dibenzofurans. Boca Raton, FL
- Marques, S.M., Antunes, S.C., Pissarra, H., Pereira, M.L., Gonçalves, F., e Pereira, R. Histopathological changes and Erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian Green Frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *In press in Aquatic Toxicology*.
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R. (2008). Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Science of Total Environment* 402:29-35
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. e Wood, C.M. (2000a). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 1: Ionoregulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* 50: 231–243.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. e Wood, C.M. (2000b). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology* 50: 245–256.
- ME - Ministério da Economia, 2001. Decreto-Lei nº 198-A, de 6 de Julho. Diário da República. I Série A, nº155:4084 (2)- 4084(7).
- Mimeault, C., Trudeau, V.L., Moon, T.W. (2006). Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPAR $\beta$ ) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*). *Toxicology* 228:140–150.
- Moore, M.R., Vetter, W. e Gaus, C., (2002). Trace organic compounds in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 45(1-12): 62-68.
- Neves, O., Magalhães, M.C.F. e Matias, M.J. (1997). Contribuição para o estudo da contaminação resultante da exploração e abandono da mina da Cunha Baixa. I. Águas superficiais e subterrâneas. *Actas X Semana de Geoquímica - IV Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa, Braga. Portugal*, 483-486.
- Newman, M.C. (1998). *Fundamentals of ecotoxicology*. Ann Harbor Press, U.S.A.

- Oliveira, J.M.S. (1997). Algumas reflexões com enfoque na problemática dos riscos ambientais associados a actividade mineira. Estudos, Notas e Trabalhos. Instituto Geológico Mineiro, tomo 39: 3-25.
- Oliveira, J.M.S, Ávila, P.F. (2001). Geoquímica na área envolvente da mina da Cunha Baixa (Mangualde, no centro de Portugal). Estudos, Notas e Trabalhos, Tomo 43: 25-47. Instituto Geológico e Mineiro.
- Ozmen, M., Güngördü, A., Kucukbay, Z., Güler, R. E. (2006). Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey. *Ecotoxicology* 15: 157–169.
- Pacheco, M. (1999). Estudo *in vivo* e *in vitro* de efeitos bioquímicos, fisiológicos e citogenéticos provocados por modificações do ambiente, em *Anguilla anguilla*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor, Universidade de Aveiro: 16, 33, 36 pp.
- Papagiannis, I., Kagalou, I., Leonardos, J., Petridis, D., Kalfakakou, V. (2004). Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environment International* 30(3): 357–362.
- Peakall, D. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Chapman & Hall, London.
- Peakall, D. e Burger, J. (2003). Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:110-121.
- Pedrosa, M.Y., Martins, H.M.L. (1999). Estudo de impacto Ambiental em Minas Abandonadas - Hidrogeologia da Mina da Cunha Baixa (Estudo preliminar). Direcção Geral do Ambiente e Instituto Geológico e Mineiro, Protocolo nº17/95. pp. 48.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M., Gonçalves, F. (2008). Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I. Soil chemical characterization. *The Science of the Total Environment* 390:377–386.
- Petrlova, J., Krizkova, S., Zitka, O., Hubalek, J., Prusa, R., Adam, V., Wang, J., Beklova, M., Sures, B., Kizek, R. (2007). Utilizing a chronopotentiometric sensor technique for metallothionein determination in fish tissues and their host parasites. *Sensors and Actuators* 127B(1): 112–119

- Poston, T.M. (1982). The bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 28: 682–690.
- Rashed, M.N. (2001). Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environment International* 27: 27–33.
- Rayment, G.E. e Barry, G.A. (2000). Indicator tissues for heavy metal monitoring – additional attributes. *Marine Pollution Bulletin* 41: 353–358.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E. (1998). Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology* 40: 375–392.
- Riethmuller, N., Markich, S.J., van Dam, R.A., Parry, D. (2001). Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). *Biomarkers* 6: 45-51.
- Santo, J.C. e Freire, A P. (1983). Tratamento de minérios pobres na mina da Cunha Baixa. *Boletim Minas* 20(3): 139-145.
- Sharifi, M., Connell, D.W. (1997). Growth rate reduction of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to p,p'DDT and chlorobenzenes in diets with differing lipid contents. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 59: 665–670.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79: 55-83.
- Slikker, Jr., W., Bowyer, J.F. (2005). Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicology Applied Pharmacology* 206: 255– 260.
- Smith, M.E., Coffin, A.B., Miller, D.L., Popper, A.N. (2006). Anatomical and functional recovery of the goldfish (*Carassius auratus*) ear following noise exposure. *Journal of Experimental Biology* 209: 4193–4202.
- Tanabe, S., Watanabe, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Nakanishi, S. e Ono, H.(2004). PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in albatross from the North Pacific and Southern Oceans: levels, patterns, and toxicological implications. *Environmental Science and Technology* 38 (2): 403–413.
- Timbrell, J.A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129: 1–12.

- USEPA (1998). United States Environmental Protection Agency. Guidelines for Ecological Risk Assessment. EPA/630/R-95/002F, Risk Assessment Forum, Washington, DC, USA.
- Van der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H. e Vermeulen, N.P.E. (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36: 189-222
- Volkoff, H., Peter, R.E. (2001). Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regulatory Peptides* 101:59–72.
- Wang, J., Wei, Y., Li, X., Cao, H., Xu, M., Dai, J., (2007). The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145C: 350–362.
- Weeks, J.M. e Comber, S.D.W. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineral Magazine* 69(5): 601-613.
- Yarsan, E., Baskaya, R., Yildiz, A., Altintas, L., Yesilot, S. (2007). Copper, lead, cadmium and mercury concentrations in the mussel *elliptio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 218–220.
- Zhang, Y. M., Huang, D. J., Wang, Y. Q., Liu, J. H., Yu, R. L., Long, J. (2005). Heavy metal accumulation and tissue damage in goldfish *Carassius auratus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75:1191–1199.
- Zakharov, V.M., Clarke, G.M. (1993). Biotest. A new integrated biological approach for assessing the condition of natural environments. Moscow Affiliate of the International Biotest Foundation, Moscow, p. 58.







## **Capítulo I. Avaliação da toxicidade aguda do efluente de uma mina de urânio abandonada (Mina da Cunha Baixa, Mangualde) para a espécie piscícola *Carassius auratus* (L. 1758)**

### **Resumo**

As minas de minério radioactivo abandonadas geram graves problemas ambientais como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, devido à produção de efluentes ácidos ricos em metais e radionuclídeos. Este trabalho teve como objectivo avaliar a toxicidade aguda do efluente de uma mina de urânio abandonada (Cunha Baixa, Mangualde, Centro de Portugal) para peixes da espécie *Carassius auratus*. A informação obtida será integrada com os dados de toxicidade já determinados para outras espécies de água doce, de diferentes níveis tróficos, de forma a fazer uma avaliação do risco que pode advir da libertação deste efluente, em sistemas de água doce vizinhos. No ensaio com o efluente, sem ajuste de pH, foi determinado, para as 24H, um  $EC_{50} = 82,90\%$  ( $IC_{95\%} = 75,2- 94,8$ ), para as 48H, um  $EC_{50} = 78,20\%$  ( $IC_{95\%} = 78,2- 86,2$ ) e para as 96H, o  $EC_{50} = 76,6\%$  ( $IC_{95\%} = 75,9- 77,3$ ). Contudo num ensaio preliminar, em que ajustou o pH para um valor próximo da neutralidade (pH=6,71), não se registou mortalidade no efluente não diluído, o que sugere que será o pH o principal factor incompatível com a sobrevivência dos peixes, sobretudo em exposições agudas.

**Palavras-Chave:** Mina de Urânio abandonada, Toxicidade aquática, *Carassius auratus*



## 1. Introdução

Nas regiões graníticas do Centro-Norte de Portugal, sobretudo nos distritos da Guarda, Viseu e Coimbra, existem várias minas de urânio e de outros minérios radioactivos abandonadas, próximas de áreas rurais e de populações humanas, das quais são de destacar, a título de exemplo, e pela importância económica que tiveram, as minas da Urgeiriça, Cunha Baixa, Quinta do Bispo e Bica. A exploração de minérios radioactivos constituiu uma actividade económica, particularmente significativa para o país, sobretudo na primeira metade do século passado, em função do envolvimento da Europa, e de Portugal em particular, em duas guerras mundiais. Contudo, as oscilações do mercado internacional de minérios, e a concorrência de outros países, com jazidas mais ricas e de operacionalidade mais fácil, levou a que a extracção destes materiais se tivesse tornado pouco lucrativa para Portugal<sup>1</sup>, conduzindo à cessação desta actividade que deixou um legado ambiental carregado de grandes perigos para a saúde humana e para os sistemas naturais. Com o reconhecimento dos perigos não negligenciáveis colocados por estas áreas degradadas, a sua recuperação foi considerada um dever do Estado, assim como uma tarefa de grande interesse público pelo Dec.Lei nº198-A/2001, de 6 de Julho (ME, 2001).

As minas de minério radioactivo abandonadas geram graves problemas ambientais como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, devido à produção de efluentes ácidos, ricos em metais e radionuclídeos (Au et al., 1998; Antunes et al., 2007a; Carvalho et al., 2007), sendo as primeiras frequentemente utilizadas como água para rega pelas populações locais que desconhecem as verdadeiras consequências de acções semelhantes (Carvalho et al., 2007). A libertação destes efluentes nas águas superficiais vizinhas pode provocar impactos nas comunidades lóticis/lénticas em virtude da sua elevada toxicidade (Tomé et al., 2006; Antunes et al. 2007a, 2007b; Marques et al. 2008).

O uso de água contaminada, a deposição de escomboreiras de minério pobre e a dispersão de lamas provenientes das lagoas de tratamento do efluente (Nero et al., 2003), podem modificar as propriedades do solo e aumentar a concentração de metais neste compartimento (e.g. Pereira et al., 2006; Pereira et al, 2008a e b), nas plantas (Pereira et al., in prep) e em invertebrados (Antunes et al., 2007a).

---

<sup>1</sup> [http://www.igeo.pt/atlas/Cap3/Cap3b\\_8.html](http://www.igeo.pt/atlas/Cap3/Cap3b_8.html), disponível em 25 de Fevereiro de 2008.

Com a necessidade emergente, um pouco por todo o mundo, de proceder à avaliação dos riscos colocados pelas áreas contaminadas e à sua recuperação, a análise de risco ecológico tem vindo a afirmar-se como uma poderosa ferramenta nos processos de tomada de decisão destinados à prossecução destes objectivos (USEPA, 1998; Suter et al., 2000; Critto et al., 2007). A metodologia da análise de risco ecológico está vastamente descrita em diversos documentos internacionais (e.g. USEPA, 1998) e europeus (Fairman et al. 1998; Weeks e Comber, 2005; Eriksson et al. 2007; Mesman et al., 2007) e pode ser definida como o processo que permite estimar a probabilidade de um ou vários efeitos adversos, para as entidades ecológicas e para os seres humanos virem a ocorrer como resultado da libertação/deposição de novas substâncias químicas, resíduos tóxicos ou efluentes industriais (análise de risco predictiva); ou de estarem já em curso devido à exposição a matrizes ambientais já contaminadas (análise de risco retrospectiva) (Suter, 2000).

No que concerne à análise de risco de locais contaminados, a avaliação pode dividir-se em várias etapas, devendo ser precedida de uma recolha de dados, o mais relevante possível para o local de estudo. Na primeira etapa (etapa 0), os contaminantes são identificados, faz-se uma inventariação dos principais eco-receptores, das diferentes vias de exposição e dos potenciais perigos que os contaminantes, presentes nas diferentes matrizes ambientais, representam para eles. Toda esta informação é integrada num modelo conceptual específico para a zona em questão, que irá servir de suporte ao processo de análise de risco (Weeks e Comber, 2005). Na etapa 1 os contaminantes de maior preocupação são quantificados, e procede-se à comparação das concentrações registadas, nas diferentes matrizes ambientais, com os valores de qualidade da água/solo legalmente estabelecidos, ou não. Uma vez confirmados os riscos, nesta avaliação preliminar, de carácter fundamentalmente químico, passa-se para a etapa seguinte (Weeks e Comber, 2005). Na etapa 2 realizam-se ensaios ecotoxicológicos agudos e sub-letais, com soluções de contaminantes produzidas em laboratório, com solos igualmente contaminados em laboratório ou sempre que possível com amostras provenientes do local contaminado.

Na avaliação ecotoxicológica de matrizes ambientais, a avaliação de parâmetros desde o nível molecular ao ecossistema seria o ideal para avaliar os perigos e quantificar os riscos (Castro et al., 2004; Antunes et al., 2007a), no entanto isso seria uma tarefa morosa e muito dispendiosa, daí que vários autores (e.g. Costan et al., 1993; Castillo et al., 2000)

defendam pelo menos a utilização de baterias de ensaios com diferentes espécies (diferentes sensibilidades) para avaliar a contaminação de um compartimento do ecossistema.

Assim, e tendo por base este pressuposto, no âmbito da análise de risco ecológico em curso para a Mina de urânio da Cunha Baixa foram já realizados ensaios ecotoxicológicos, em laboratório com uma bateria de espécies de água doce, nomeadamente algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), cladóceros (*Daphnia magna* e *D. longispina*) e com ovos e larvas de rã-verde (*Rana perezi*), que demonstraram a toxicidade aguda e sub-letal do efluente (Antunes et al., 2007a, 2007b; Marques et al., 2008). Adicionalmente, registaram-se ainda alterações histopatológicas e anomalias nucleares eritrocíticas em adultos de rã-verde residentes nas lagoas do efluente mineiro. A toxicidade aguda do efluente da mina da Cunha Baixa para peixes foi igualmente demonstrada num ensaio *in situ*, durante o qual peixes da espécie *Carassius auratus* morreram poucas horas após exposição ao efluente (Bessa et al, submmited). No entanto a morte dos organismos expostos esteve muito provavelmente associada ao facto de o pH do efluente ser incompatível com a sua sobrevivência, por provocar entre outros efeitos desequilíbrios osmóticos irreversíveis (Morris et al. 1989; Mason, 1996), pelo que se torna importante distinguir os efeitos decorrentes da acidez extrema, daqueles eventualmente causados, pelas espécies metálicas em solução. Assim é particularmente importante perceber qual o papel da mistura complexa de metais e de radionuclídeos do efluente na produção de efeitos tóxicos, na medida em que os organismos que ocorrem em sistemas naturais com contaminação industrial, raramente, senão mesmo nunca, estão expostos a contaminantes individuais (Pyle et al., 2001). Os peixes têm mostrado ser um grupo de consenso, no que refere à sua utilização em ensaios ecotoxicológicos, para a obtenção de resultados que demonstrem o impacto de efluentes mineiros nos ecossistemas aquáticos (Poston, 1982; Scroggins et al., 2002; Viadero e Tierney, 2003; Gerhardt et al. 2005; Couture e Pyle, 2008). Estes organismos pelo facto de estarem frequentemente representados em ecossistemas aquáticos, pela sua posição intermédia nas cadeias alimentares, como consumidores primários ou secundários, e por poderem pertencer à cadeia alimentar do Homem, são um grupo de grande interesse numa análise de risco ecológico. Os peixes possuem ainda um grande potencial de bioacumulação (Van der Oost, 2003) e portanto alto potencial de toxicidade para seres humanos (USEPA, 1989). Assim este trabalho teve

como objectivo avaliar a toxicidade aguda do efluente da mina da Cunha Baixa, para uma espécie de peixe de água doce e avaliar ainda se este efeito é devido ao pH, ao seu conteúdo em metais e radionuclídeos ou a uma combinação de todos estes factores. Para o efeito, peixes da espécie *Carassius auratus* foram sujeitos a exposições de 96h ao efluente, com e sem ajuste do pH para valores próximos da neutralidade, levadas a cabo em laboratório.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Local de estudo

A mina de urânio da Cunha Baixa (Mangualde, Centro de Portugal) implantada na planície uranífera das beiras, foi encerrada há já alguns anos, contudo continua a representar um grave problema ambiental e de saúde pública. Os riscos para a saúde humana derivam sobretudo da possível transferência de alguns elementos metálicos (entre os quais se destaca o urânio, não só pela sua toxicidade química, como pela sua radioactividade) do solo para o Homem através de alimentos de natureza vegetal e animal. Neste sentido importa referir que estudos prévios demonstraram que espécies vegetais como o milho, cultivadas nas áreas adjacentes à mina e regadas com água contaminada, acumulam níveis elevados de metais, em particular de urânio (Neves et al., 2008). Do mesmo modo, o consumo de água proveniente de furos e poços locais, constitui outra via de exposição significativa, na medida em que se registaram níveis elevados de metais e radionuclídeos nas águas subterrâneas (Machado, 1998; Neves et al. 1997). A acrescer aos perigos químicos, existem ainda os perigos radiológicos, derivados da própria constituição geológica da zona e da acumulação local de lamas e de escombreliras ricas em radionuclídeos (Neves e Matias, 1999).

Contudo, em termos ambientais, o principal problema da zona resulta do processo de tratamento de minério pobre em urânio, levado a cabo no passado. A extracção de minério, na mina da Cunha Baixa, foi feita fundamentalmente por lavra subterrânea, mas nos últimos anos o minério pobre passou então a ser tratado por lixiviação estática *in situ*, por injeção de ácido sulfúrico nos minérios pobres para extrair óxido de urânio (Pereira et al. 2004; Santo e Freire, 1983). As soluções eram recolhidas na galeria imediatamente



inferior ao fundo da lavra para depois se proceder à bombagem para a superfície, onde o urânio era recuperado por permuta iónica em leito fluído. As resinas resultantes eram então transportadas para a Oficina de Tratamento Químico (OTQ) da Urgeiriça (Santo e Freire, 1983). Este processo ainda hoje é responsável pela produção contínua de um efluente ácido, rico numa mistura complexa de metais e de elevada toxicidade (Antunes et al., 2007a; 2007b; Marques et al., 2008) que parece ser o principal responsável pela contaminação dos lençóis freáticos (Pereira et al., *in prep.*).

## 2.2. Caracterização química do efluente

O efluente ácido da mina de urânio da Cunha Baixa foi já caracterizado em trabalhos anteriores (Antunes et al., 2007a; Marques et al., 2008). Assim, de acordo com Marques et al. (Tabela 1) o pH do efluente é bastante ácido, com um valor bem abaixo dos valores máximos recomendados (VMR) pela legislação Portuguesa; a sua condutividade foi igualmente muito elevada, cerca de 575 vezes superior ao recomendado pela legislação portuguesa, facto que atesta a presença de um grande número de solutos ionizáveis e confirma uma elevada mineralização destes efluentes. O efluente caracteriza-se ainda por uma mistura complexa de metais, com níveis muito elevados de berílio, manganésio, ferro, níquel, zinco, e urânio, bem acima de VMR ou de VMA, estabelecidos pela legislação portuguesa, ou de valores de rastreio para águas superficiais estabelecidos pela EPA (Tabela 1).

De acordo com Antunes et al. (2007b), o efluente apresenta ainda flutuações químicas sazonais, tendo estes autores verificado que no Outono, tanto a condutividade como o total de metais aumentaram e o pH diminuiu, conduzindo a uma diminuição de cerca de duas vezes nos valores de EC<sub>50</sub> dos organismos testados: *P.subcapitata*, *D. magna* e *D. longispina*. Ainda segundo os mesmos autores, no Outono, verificaram-se valores superiores aos MRV (MA, 98) para alumínio, manganésio e ferro. O valor de urânio triplicou relativamente ao encontrado na Primavera, de 552 µg/l para 1842 µg/l. Este valor esteve igualmente de acordo com o encontrado por Marques et al. (2008, tabela 1)

Os valores registados para a concentração de urânio foram, nos dois estudos (Antunes et al., 2007b e Marques et al., 2008), cerca de 6000 vezes superiores aos valores propostos pela Environmental Pollution Agency (EPA), para águas superficiais, situando-

se, contudo, abaixo do valor de NOEC (do Inglês *No Observed Effect Concentration*) registrado por Sheppard et al. (2005), para peixes de água doce. Este último autor destacou no entanto que a toxicidade e a biodisponibilidade dos metais, em especial do urânio, está muito relacionada quer com o pH, quer com a dureza da água.

**Tabela 1** – Parâmetros físico-químicos gerais e concentração total de metais no efluente da mina da Cunha Baixa ( $\mu\text{g/l}$ ). Os metais foram analisados por espectrometria de massa, com plasma induzido acoplado (ICP/MS) e a dureza foi calculada após determinação por ICP-MS das concentrações de Ca and Mg (Marques et al., 2008).

	EC20 - SB	EPA R4- SB	SW EPA R5-SB	SW EPA R6 FW - SB	VMR	VMA	M
<b>Dureza CaCO<sub>3</sub></b> (mg/l)					VLND	500	27.8
<b>O<sub>2</sub> Dissolvido</b> (mg/l)					VLND	VLND	6.6
<b>Conductividade</b> ( $\mu\text{S/cm}$ )					400	VLND	23000
<b>pH</b>					6.5-8.4	VLND	4.25
<b>Metal (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>							
Be	VLND	0.53	3.6	5.3	VLND	VLND	<b>23</b>
Al	75	87	VLND	87	50	200	---
Mn	VLND	VLND	VLND	120	20	---	<b>7450</b>
Fe	VLND	1000	VLND	1000	50	200	<b>3260</b>
Ni	11	87.7	28.9	87.4	---	50	<b>154</b>
Zn	21	58.91	65.7	58.1	5	VLND	<b>451</b>
Sr	VLND	VLND	VLND	1500	VLND	VLND	65.3
Pb	0.35	1.32	1.17	1.0	VLND	50	0.69
U	VLND	VLND	VLND	700	VLND	VLND	<b>1750</b>

VMR e VMA correspondem a valores máximos recomendáveis e valores máximos admissíveis de águas para consumo humano.

EC20 – Sensitive species surface water screening benchmark. Disponível em [http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench\\_select](http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench_select) (9/12/2007);

EPA R4 Chronic Surface water screening benchmark. Disponível em [http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench\\_select](http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench_select) (9/12/2007);

SW EPA R5 ESL Surface water screening benchmark. Disponível em [http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench\\_select](http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench_select) (9/12/2007);

SW – EPA R6 FW Surface water screening benchmark. Disponível em [http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench\\_select](http://rais.ornl.gov/cgi-bin/eco/bench_select) (9/12/2007);

VLND – valores legais não disponíveis.

As concentrações de metais que excedem os critérios de qualidade disponíveis estão destacados a bold.

### 2.3. Organismo teste

O organismo teste seleccionado para a realização dos ensaios de toxicidade aguda do efluente da Mina da Cunha Baixa, foi o peixe de água doce da espécie *Carassius auratus* (L. 1758). Esta espécie pertence à família Cyprinidae, da qual fazem parte espécies (e.g. *Carassius carassius*) frequentes nas águas dos rios do centro de Portugal. Contudo, *Carassius auratus* foi a espécie seleccionada por ser de fácil aquisição e manutenção em laboratório. Os peixes foram adquiridos numa loja de aquariofilia e tinham entre 1,5-3g de peso fresco e 5-6 cm de comprimento. Todos os peixes utilizados nos ensaios foram provenientes do mesmo lote. A aclimação decorreu durante 2 semanas. Durante este período os peixes foram colocados em aquários de vidro contendo água doce reconstituída de baixa dureza (do Inglês: *soft synthetic freshwater*) (ASTM, 1980), numa proporção, no caso do ensaio preliminar de 1 peixe/0,5L, e no ensaio definitivo, 1 peixe/3,5L de efluente, respeitando deste modo no segundo ensaio, com um tempo de exposição superior, os protocolos padronizados (USEPA, 2002; OECD, 1992). Todos os aquários foram equipados com um filtro e com arejamento contínuo e, mantidos à temperatura de 20°C ± 1°C e fotoperíodo de 16h<sup>L</sup>:8h<sup>D</sup>. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, três vezes por semana, com alimento para peixes de aquário (Tetramin<sup>®</sup> - Tetra, Melle, Alemanha). No intervalo de 48H que antecedeu o ensaio, não foi administrado qualquer alimento.

### 2.4. Ensaio Ecotoxicológicos

#### 2.4.1. Amostragem do efluente

O efluente mineiro foi recolhido em garrações de plástico, de 5L de capacidade, previamente utilizados para consumo humano de água, que foram cheios até à sua capacidade máxima, para eliminar o oxigénio, devidamente tapados e transportados de imediato para o laboratório (período máximo de transporte 1h). No laboratório o efluente foi armazenado a 4°C, até ser utilizado para realização dos ensaios (período máximo de

armazenamento 48h). Antes dos ensaios o efluente foi filtrado, com filtro de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro e 1,20 µm de poro.

#### *2.4.2. Ensaio preliminar*

O ensaio preliminar foi realizado com o intuito de definir a gama de diluições do efluente, apropriada para determinar valores de EC<sub>50</sub> para o organismo teste, e ainda para discriminar o papel do pH na toxicidade aguda do efluente. Assim para este ensaio foram definidas 6 concentrações do efluente: 100%, 83,33%, 69,44%, 57,87%, 48,23%, 40,19% e o controlo composto por água doce reconstituída de baixa dureza (ASTM, 1980). Para cada concentração foram consideradas 10 réplicas, em cada uma das quais os peixes foram expostos ao efluente diluído com água doce reconstituída de baixa dureza, em garrafas de plástico, numa proporção de 500 ml/peixe.

Os peixes foram ainda expostos ao efluente não diluído (1 peixe/réplica), com pH previamente ajustado para um valor de 6,71, através da adição de NaOH (5M).

O ensaio decorreu durante 24H, nas mesmas condições de oxigenação, temperatura e fotoperíodo definidas para o período de aclimação, mas sem fornecimento de alimento, e com observações às 6, 12, 24h de exposição. Em cada um destes momentos, os peixes mortos, em cada uma das réplicas, foram contabilizados e removidos das garrafas. Os peixes foram considerados mortos quando não se registava qualquer movimento (e.g. movimento das brânquias) e quando não havia qualquer reacção a estímulos mecânicos na barbatana caudal. O pH foi medido em duas réplicas de cada concentração, seleccionadas aleatoriamente, no início e no final do ensaio.

#### *2.4.3. Ensaio definitivo*

No ensaio de toxicidade aguda definitivo os organismos (n=7), foram expostos a 6 concentrações do efluente (sem ajuste de pH): 100%, 90,9%, 82,6%, 75,1%, 68,3% e ao controlo constituído por água doce reconstituída de baixa dureza (ASTM, 1980), durante 96H, em garrafas de plástico, previamente utilizados para consumo humano de água, num volume total de 3,5L/peixe, de acordo com os critérios definidos por protocolos padronizados (OECD, 1992; USEPA, 2002). A gama de concentrações definida teve por base os resultados do ensaio preliminar e as condições de exposição foram semelhantes às

descritas para o ensaio preliminar. Cada uma das réplicas foi observada às 24, 48 e 96h, para contabilização e remoção dos peixes e para monitorização do pH.

### **2.5. Análise estatística**

A concentração do efluente, letal para 50% dos organismos teste ( $EC_{50}$  ou  $LC_{50}$ ), para 24, 48 e 96 h de exposição, foi calculada com recurso à análise de Probit (Finney, 1971). De forma a testar a existência de diferenças significativas entre os valores de pH, medidos no início e no final do ensaio preliminar, foi realizada uma análise de variância de uma via (Zar, 1996).

## **3. Resultados**

### **3.1. Ensaio Preliminar**

A tabela 1 representa os valores de pH monitorizados nas diferentes concentrações do efluente testado, no início e no final do ensaio. Da análise da tabela destaca-se o facto de se observar uma ligeira tendência para um aumento do pH, ao longo do tempo de exposição. Contudo, essas variações não foram significativas ( $F=2,564$ ; d.f.=1;  $p=0,116$ ).

**Tabela 1** - Valores médios de pH, monitorizados no início e no final do ensaio, nas diferentes concentrações do efluente testadas.

	Tempo de Exposição	
	0h	24h
<b>Concentração do efluente (%)</b>		
CTL	6,62	7,05
40,19	5,68	6,55
48,23	5,42	6,09
57,87	5,03	5,56
69,44	4,4	4,97
83,33	4,14	4,63
100,00	3,94	4,15
100,00 B	6,71	6,68

A tabela 2 reporta os resultados do ensaio preliminar, para uma gama de diluições do efluente, a variar entre 40,19 -100,00 %, sem ajuste de pH, assim como para o efluente não diluído, com o pH ajustado para um valor próximo da neutralidade (100,0%B). Como é possível observar só se registou mortalidade em concentrações do efluente igual ou superiores a 83,33%. E no caso particular da concentração mais alta, 10% dos peixes estavam mortos, logo após as primeiras 6 horas de exposição, tendo sido atingida uma percentagem de 100% de mortalidade, às 24 horas. Na diluição de 83,33% apenas 40% dos organismos morreram após 24h de exposição, o que indica que para a determinação de um valor de  $EC_{50}$ , a gama de concentrações do efluente a testar deverá ser estreitada e, deverá incluir uma concentração próxima desta numa posição intermédia. No efluente não diluído (100,00% B) com o valor de pH ajustado, não se registou mortalidade no tempo de exposição considerado. O mesmo se verificou no grupo controle, ao longo de todo o período de exposição, o que nos permitiu validar o teste.

**Tabela 2** - Percentagem cumulativa de peixes mortos (n=10) no final de diferentes tempos de exposição a diferentes concentrações de efluente da mina de urânio da Cunha Baixa, diluído com água doce reconstituída de baixa dureza (ASTM, 1980) sem ajuste de pH. A concentração 100,00% (B) refere-se à concentração de 100% do efluente, com acerto de pH, para 6,71.

	Tempo de Exposição		
	6h	12h	24h
<b>Concentração do efluente (%)</b>			
CTL	0	0	0
40,19	0	0	0
48,23	0	0	0
57,87	0	0	0
69,44	0	0	0
83,33	0	10	40
100,00	10	60	100
100,00 (B)	0	0	0

### 3.2. Ensaio Definitivo

A tabela 3 descreve os resultados registados durante o ensaio agudo, em que o efluente foi testado para uma gama de concentrações a variar entre 68,30-100,00%, sem ajuste de pH. Como é possível observar na mesma tabela, não houve uma variação significativa do pH do efluente durante o ensaio. A mortalidade dos organismos foi registada em concentrações iguais ou superiores a 75,10%, com pH a variar entre 4 e 4,5, logo após as primeiras 24h de exposição. No entanto, na concentração de 68,3%, não obstante o pH ser igualmente muito ácido (4,3-4,7) não se registou mortalidade. Assim, podemos inferir que na concentração superior a 75,10% a mortalidade observada foi induzida pelas espécies metálicas e possivelmente pelos radionuclídeos em solução no efluente.

Nas concentrações de 90,90 e 100%, com valores de pH inferiores a 4, a mortalidade foi de 100%, logo após 24 horas de exposição. Com este ensaio foi possível calcular valores de  $EC_{50}$  do efluente para *Carassius auratus*, para os diferentes tempos de exposição. Assim, obtiveram-se os seguintes valores de toxicidade aguda:  $EC_{50-24h} = 82,90\%$  ( $IC_{95\%} = 75,2- 94,8$ ),  $EC_{50-48h} = 78,20\%$  ( $IC_{95\%} = 78,2- 86,2$ ) e para as 96H, o  $EC_{50-96h} = 76,6\%$  ( $IC_{95\%} = 75,9- 77,3$ ), contudo, neste caso, não se conseguiu convergência no modelo "Probit".

**Tabela 3** – Percentagem cumulativa de peixes mortos (n=7) no final de diferentes tempos de exposição, a diferentes concentrações de efluente da mina, diluído com meio de água de baixa dureza (ASTM, 1980), sem ajuste de pH.

Concentração do efluente (%) sem ajuste de pH	Variação de pH	Tempo de exposição		
		24h	48h	96h
CTL	7,5-7,8	0	0	0
68,30	4,3-4,7	0	0	0
75,10	4,0-4,5	14,3	14,3	28,6
82,60	3,8-3,9	28,6	42,9	100
90,90	3,6-3,6	100	100	100
100,00	3,5-3,5	100	100	100

#### 4. Discussão

Os testes de toxicidade com efluentes (do inglês Whole Effluent Tests *WET*) apresentam algumas desvantagens, como sejam: i) o facto de serem geralmente realizados em laboratório e por isso não reflectirem as exposições combinadas ao efluente, à falta de alimento/excesso de nutrientes, ao *habitat* empobrecido, a níveis de oxigénio reduzidos etc.; ii) não serem realizados na presença de processos ambientais que podem minimizar a exposição (hidrólise, oxidação-redução, complexação) e, iii) reflectirem a toxicidade total sem permitirem discernir quais os contaminantes por ela responsáveis (Chapman, 2000; Maltby et al., 2000). Contudo são excelentes ferramentas de rastreio ecotoxicológico, a serem usadas em análise de risco ecológico (Chapman, 2000).



Os resultados obtidos no presente estudo, com recurso aos referidos ensaios, confirmaram uma vez mais a toxicidade aguda do efluente da mina de urânio da Cunha Baixa, para mais um nível trófico dos sistemas de água doce, os peixes. De facto verificou-se uma mortalidade de 100% dos organismos após 24H de exposição ao efluente não diluído ( $\text{pH} \approx 4$ ). Contudo, quando a exposição foi feita ao efluente não diluído, mas com o valor de pH ajustado para um valor próximo da neutralidade [100,00% (B)], não se registou mortalidade. Este facto sugere que terá sido o pH baixo, o principal factor incompatível com a sobrevivência dos organismos expostos. Os epitélios sensíveis das brânquias e as células produtoras de muco podem ser destruídas pela acção do pH ácido, interferindo quer no equilíbrio ácido-base, quer no processo de osmorregulação (Kroglund e Staurnes, 1999; Magee et al. 2001) pondo em causa a sobrevivência dos peixes. De facto, as brânquias dos peixes têm um papel importante no contacto do organismo com o ambiente. Nelas ocorre não só a troca de gases, como trocas iónicas importantes para o equilíbrio iónico e osmorregulação (McDonald et al. 1989). Logo o pH da água é determinante para o movimento iónico através das brânquias e até para a difusão de  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  durante a respiração quer por reacções que possam ocorrer com os iões  $\text{H}^+$  quer pela competição com outros iões positivos, devido à maior afinidade com os canais iónicos das membranas. Por outro lado o pH pode alterar a biodisponibilidade dos metais e potenciar, não só, a sua toxicidade, como também a formação de ligandos inorgânicos e orgânicos (carbonatos, fosfatos, iões hidroxilo) (Fortin, 2004). Gerhardt et al. (2005) confirmaram que a toxicidade de um efluente ácido mineiro, em *Daphnia* e *Gambusia* estava dependente do pH e estabeleceram uma forte correlação linear entre o pH e os metais em solução presentes nesse efluente. Anteriormente outros autores haviam já determinado qual o valor de pH deste tipo de efluentes que permitia distinguir a toxicidade causada pelos metais da promovida pela acidez (Lopes et al., 1999a).

A avaliação do efluente da mina de urânio da Cunha Baixa havia já sido iniciada por Antunes et al. (2007a), para duas estações do ano diferentes, utilizando duas espécies de cladóceros (*Daphnia magna* e *D. longispina*) e uma espécie de alga verde (*Pseudokirchneriella subcapitata*). De acordo com estes autores a toxicidade do efluente foi particularmente mais elevada no Outono, sendo esta variabilidade possivelmente explicada pelo facto de o valor de pH neste período ter sido significativamente mais reduzido, o que terá contribuído para uma maior mobilização de praticamente todos os

elementos metálicos, mas sobretudo de: alumínio, manganês, ferro, cobalto, urânio e estrôncio. Assim o valor de pH, registado por Antunes et al. (2007a), neste período do ano, foi igual a 3,5, sendo por isso igual ao valor registado, durante o ensaio com *Carassius auratus*. Assim e comparando os valores de EC<sub>50</sub> obtidos, verifica-se que a sensibilidade das espécies variou da seguinte forma:

<i>Carassius auratus</i>	<	<i>Daphnia magna</i>	<	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<	<i>D. longispina</i>
EC <sub>50-24h</sub> =82,90%		EC <sub>50-48h</sub> =35.8		EC <sub>50-96h</sub> =27.0		EC <sub>50-48h</sub> =20.5
(IC <sub>95%</sub> = 75,2- 94,8)		(IC <sub>95%</sub> =26,75- 50,78)		(IC <sub>95%</sub> =25,49- 28,42)		(IC <sub>95%</sub> =16,95- 24,25)
EC <sub>50-48h</sub> =78,20%						
(IC <sub>95%</sub> =78,2- 86,2)						
EC <sub>50-96h</sub> = 76,6%						
(IC <sub>95%</sub> = 75,9- 77,3)						

Dos resultados destes estudos verificou-se que a espécie nativa (*D. longispina*) foi a que demonstrou maior sensibilidade a efeitos agudos. Estudos anteriores, levados a cabo pelo nosso laboratório, mostraram igualmente níveis mais baixos de tolerância, a xenobióticos (Antunes et al. 2007a) e a efluentes industriais (Pereira et al., in prep.), para a mesma espécie quando comparados com os registados para *D.magna*, espécie para a qual os ensaios estão padronizados, mas que não está presente nos nossos ecossistemas de água doce. Tal facto não só aumenta as preocupações relativas ao impacto da libertação de efluentes com uma composição química semelhante, em meios de água doce existentes em território nacional, como reforça uma vez mais a necessidade de se introduzirem espécies nativas nas avaliações de risco de locais contaminados.

Os peixes mostraram ser a espécie menos sensível, na medida em que apresentaram valores de EC<sub>50</sub> correspondentes a concentrações do efluente superior a 75%. Contudo, é possível prever os perigos que advêm, de forma indirecta, da libertação deste efluente, para um sistema de água doce, como por exemplo a ribeira que passa junto à área de exploração mineira, independentemente da capacidade que esse meio receptor possa ter para diluir o efluente, pois como é possível verificar, com diluições na ordem dos 70%, organismos de dois níveis de base das cadeias tróficas, os produtores e os consumidores primários, são afectados de forma aguda, o que pode levar a desequilíbrios nas respectivas populações e a que grande parte dos indivíduos sejam dizimados, provocando desequilíbrios na cadeia trófica. De facto, Jooste e Thirion (1999) numa avaliação do biota de um riacho sujeito à

---

descarga de um efluente ácido mineiro, verificaram que a integridade biológica da maioria dos grupos taxonómicos se encontrava afectada.

No presente estudo a mortalidade dos peixes da espécie *Carassius auratus* foi registada em concentrações iguais ou superiores a 75,10%, com pH a variar entre 4 e 4,5, logo após as primeiras 24h de exposição. No entanto, na concentração de 68,3%, não obstante o valor de pH ser igualmente muito ácido (4,3-4,7) não se registou mortalidade. Assim, podemos inferir que a mortalidade observada na concentração de 75,10% terá sido sobretudo provocada pelos elementos metálicos ainda em solução. Para concentrações superiores do efluente torna-se difícil discernir o papel do pH e dos metais/radionuclídeos na toxicidade aguda do efluente. Os efluentes mineiros são ricos em metais e outros compostos inorgânicos e orgânicos que afectam a biodisponibilidade e a toxicidade dos metais (Campbell, 1996, Lopes et al., 1999b). A mistura complexa deste efluente, bem como a grande quantidade de iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , o baixo pH e a potencial especiação de metais torna difícil distinguir o papel dos metais e da acidez do efluente na sua toxicidade aguda. Alguns trabalhos mostraram já os efeitos tóxicos de alguns metais em órgãos de peixes, nomeadamente: alumínio (Kroglund et al., 2007), cádmio e zinco (McGeer et al. 2000b; Dayeh et al. 2005), arsénio e cobre (Erickson et al., 1996; McGeer et al. 2000b), mercúrio (Ribeiro et al., 2008), chumbo (McDonald et al., 2000 e Grosell et al. 2006) e metais em geral (di Toro et al. 2001, e Ciardullo et al., 2008). No entanto para o urânio, as informações são mais escassas. Alguns estudos testaram os efeitos do ião urânio a diferentes níveis de pH e de dureza da água. (Labrot et al 1999; Riethmuller et al. 2001 Charles et al. 2002 ; Sheppard et al. 2005). De acordo com Sheppard et al. (2005), a toxicidade e a biodisponibilidade dos metais, em especial do urânio, está muito relacionada quer com o pH, quer com a dureza da água. Este mesmo autor indicou um valor NOEC, para peixes de água doce, de 2,8 mg urânio/l para águas com dureza entre 10 e 100 mg  $\text{CaCO}_3$ /l. Por sua vez Labrot et al. (1999) registaram um valor de  $\text{EC}_{50}/\text{LC}_{50}$  para urânio de 3,05mg/l para *Brachydanio rerio* expostos por um período de 4 a 11 dias. Segundo estes mesmos autores, o urânio mostrou ser 1660 vezes mais tóxico que o chumbo, por exemplo, para peixes, que demonstraram ser mais sensíveis ao urânio que a amêijoa do género *Corbicula* e a minhoca do género *Eisenia*.

A concentração de urânio registada no efluente da mina da Cunha Baixa, por Antunes et al, 2007a, foi de 1404  $\mu\text{g}/\text{l}$ , não muito diferente da encontrada por Marques et

al., 2008, 1750µg/l, estando ambas abaixo dos valor de EC<sub>50</sub> apresentado por Labrot et al. (1999). Tal facto sugere, que não apenas o urânio, mas outros metais podem ter estado na origem da mortalidade dos peixes, a concentrações do efluente em que o baixo pH deixa de exercer toxicidade aguda (75,10%). De facto, Justyn *et al.* (1985), citados por Labrot et al, (1999), mostraram que os peixes acumulam rádio e urânio mais lentamente do que os outros organismos aquáticos. Os mesmos autores verificaram ainda que os organismos da coluna de água, acumulam cerca de 10 vezes menos radionuclídeos do que os organismos que vivem junto ao sedimento. Por sua vez, Labrot et al. (1999) registaram baixos BCFs (do Inglês: *bioconcentration factors*), em peixes expostos a urânio e observaram ainda que a capacidade de depuração da espécie testada era elevada, quando removida a exposição ao efluente. Este facto poderá dever-se à eficácia dos processos de destoxificação e capacidade de depuração dos peixes.

Não obstante o facto da toxicidade aguda do efluente da mina de urânio da Cunha Baixa apenas ter sido registada para concentrações elevadas do efluente, que podem não ocorrer após o efeito de diluição dos sistemas receptores, não se deve ignorar a possível ocorrência de efeitos sub-letais neste grupo de organismos, para exposições a concentrações menores do efluente. A exposição contínua a metais já mostrou ter consequências ao nível do stress oxidativo (Fenet et al., 1998; Zang et al. 2005; Begum, 2006; Gioda et al 2007) e comportamental (Gill et al. 1991, 1992; Peakall, 1992; Beaumont et al. 2000; Castro et al. 2004) daí que serão de esperar estes efeitos em peixes expostos a este efluente, após a sua entrada nas correntes de água doce adjacentes. Por este motivo a toxicidade sub-letal quer do efluente, quer dos principais contaminantes que o compõem deve igualmente ser avaliada de modo a permitir uma avaliação mais correcta dos perigos colocados às cadeias tróficas dos sistemas de água doce.

## 5. Conclusão

Entre as diferentes espécies testadas *Carassius auratus* foi a que demonstrou menor sensibilidade quando exposta ao efluente ácido da mina de urânio da Cunha Baixa. Para elevadas concentrações do efluente (acima de 75%) torna-se difícil distinguir o papel do pH do dos metais, na mortalidade dos organismos. O efluente não diluído, com pH ajustado para um valor próximo da neutralidade, não induz mortalidade em exposições

agudas, o que sugere que terá sido sobretudo o pH ácido, o factor de maior incompatibilidade com a sobrevivência dos organismos. Os resultados deste estudo e de estudos anteriores sugerem contudo, que mesmo que o meio receptor deste efluente tenha um elevado poder de diluição, os peixes podem ser afectados indirectamente, por desequilíbrios na cadeia trófica, uma vez que este efluente apresentou toxicidade aguda, para espécies de níveis tróficos inferiores, em concentrações na ordem dos 30%. A toxicidade sub-letal deste efluente para peixes terá igualmente que ser avaliada.

## Bibliografia

- Antunes, S.C., Pereira, R. e Gonçalves, F., 2007a. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(2): 207-213.
- Antunes, S.C., de Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R. e Gonçalves, F., 2007b. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374: 252-259.
- APHA, 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th Edition USA. Pp. 811-867.
- ASTM, 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macro invertebrates and amphibians. Report E 729-80. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA
- ASTM, 1997. Standard guide for conducting acute toxicity tests on aqueous ambient samples and effluents with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Report E 1192-97. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA
- ATSDR, 1999. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for uranium. U.S. Department of health and human services. Pp. 462.
- Au, W.W., McConnell M. A., Wilkinson, G. S., Ramanujam, V. M. S. e Alcock, M., 1998. Population monitoring: experience with residents exposed to uranium mining/milling waste. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 405(2): 237-245.
- Beaumont, M.W., Butler, P.J. e Taylor, E.W., 2000. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquatic Toxicology* 51: 259-272.
- Begum, G., Venkateswara, R.J. e Srikanth, K., 2006. Oxidative stress and changes in locomotor behavior and gill morphology of *Gambusia affinis* exposed to chromium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 88(2): 355–365.
- Campbell, P.G.C. e Tessier, A., 1996. Ecotoxicology of metals in the aquatic environment: geochemical aspects. In: M.C. Newman and C.H. Jagoe, Editors, *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*, CRC Press, Boca Raton, FL.

- 
- Carvalho, F.P., Madruga, M.J., Reis, M.C., Alves, J.G., Oliveira, J.M., Gouveia, J. e Silva L., 2007. Radioactivity in the environment around past radium and uranium mining sites of Portugal. *Journal of Environmental Radioactivity* 96(1-3): 39-46.
- Castillo, G.C., Vila, I.C. e Neild, E., 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology* 15: 370-375.
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L. e Ribeiro, R., 2004. An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13(7): 667-681.
- Chapman, P.M., 1995. Ecotoxicology and Pollution-Key Issues. *Marine Pollution Bulletin*. 31(4-12): 167-177.
- Chapman, P.M., 2000. Whole effluent toxicity testing - usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 3-13.
- Charles, A.I., Markich, S.J., Stauber, J.L. e de Filippis, L.F., 2002. The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chorella* sp.) *Aquatic Toxicology* 60: 61-73.
- Ciardullo, S., Aureli, F., Coni, E., Guandalini, E., Lost, F., Raggi, A., Rufo, G. e Cubadda, F., 2008. Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(7): 2442-2451.
- Costan, G., Bermingham, N., Blaise, C. e Ferrard, J.F., 1993. Potencial Ecotoxic Effect Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potencial of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality* 8: 115-140.
- Critto, A., Carlon, C., Semenzin, E., Rutgers, M., Marcomini, A. 2007. Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part II. A multi-criteria based system for the selection of bioavailability assessment tools. *Science of the Total Environment* 379(1):34-45
- Dayeh, V.R., Lynn, D.H., Bols, N.C., 2005. Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology in Vitro* 19 (3):399-410

- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R. e Santore, R.S., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2383–2396.
- Eriksson, E., Baun, A., Scholes, L., Ledin, A., Ahlman, S., Revitt, M., Noutsopoulos, C., Mikkelsen, P.S., 2007. Selected stormwater priority pollutants - a European perspective. *Science of the Total Environment* 383(1-3):41-51
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson, H.P. e Leonard, E.N., 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 181–193.
- Fairman, R., Mead, C.D. e Williams, P.W., 1998. Environmental Risk Assessment - Approaches, Experiences and Information Sources. Environmental issue report nº4 European Environment Agency.  
Disponível em <http://reports.eea.europa.eu/GH-07-97-595-EN-C2/en/chapt6refh.html>, 11 de Abril, 2008)
- Fenet, H., Casellas, C. e Bontoux, J., 1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40: 137-143.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 974-981
- Gerhardt, A., 1998. Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792): survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 309–316.
- Gerhardt, A., De Bisthoven, L.J., Soares, A.M.V., 2005. Evidence for the Stepwise Stress Model: *Gambusia holbrooki* and *Daphnia magna* under acid mine drainage and acidified reference water stress. *Environmental science & technology* 39(11):4150 - 4158
- Gill, T.S., Tewari, H. e Pande, J., 1991. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* Ham. (rosy barb). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part 100C*: 501–505.



- Gill, T.S., Tewari, H. e Pande, J., 1992. Short- and long-term effects of copper on the rosy barb (*Puntius conchoni* Ham.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 23: 294–306.
- Gioda, C.R., Lissner, L.A., Pretto, A., da Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J.R., Morsch, V.M. e Loro, V.L., 2007. Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere* 69(1): 170-175.
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W., 2001. Toxic effects of metals. In Casarett & Doull's.
- Grosell, M., Gerdes, R. e Brix, K.V., 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(4): 473-483.
- Hinton, E.D., Kullman, S.W., Hardman, R.C., Volz, D.C., Chen, P.J., Carney, M. e Bencic, D.C., 2005. Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12): 635-648.
- Jooste, S. e Thirion, C., 1999. An ecological risk assessment for a South African acid mine drainage. *Water Science and Technology* 39 (10-11): 297-303
- Kelly, M., 1988. Mining and the freshwater environment. Elsevier Science Publishers, Essex, UK.
- Kroglund, F., Finstad, B., Stefansson, S.O., Nilsen, T.O., Kristensen, T., Rosseland, B.O., Teien, H.C. e Salbu, B., 2007. Exposure to moderate acid water and aluminum reduces Atlantic salmon post-smolt survival. *Aquaculture* 273(2-3): 360-373.
- Kroglund, F. e Staurnes, M., 1999. Water quality requirements of smolting Atlantic salmon (*Salmo salar*) in limed acid rivers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 2078–2086.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Saint Denis, M. e Ribera, D., 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36(2): 167-178.
- Lopes, I., Gonçalves, F., Soares, AM.V.M. e Ribeiro, R., 1999a. Discriminating the ecotoxicity due to metals and to low pH in acid mine drainage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 207-214.

- Lopes, I., Gonçalves, F., Soares, A.M.V.M. e Ribeiro, R., 1999b. Ecotoxicological tools in the remediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology and Chemistry* 70: 441-460.
- MA- Ministério do Ambiente, 1998. Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto. Ministério do Ambiente. Diário da República nº 176/98 Série I-A:3676-3722.
- MacDonald, A., Silk, L., Schwartz, M. e Playle, R.C., 2002. A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 227–242.
- Machado, M.J.C., 1998. Estudo de impacto ambiental em minas abandonadas - comportamento dos metais dissolvidos nas águas da Cunha Baixa e Quinta do Bispo. Secção de Hidroquímica- Relatório 16/H/98 Instituto Geológico e Mineiro - Ministério da Economia, Lisboa.
- Magee, J.A., Haines T.A., Kocik, J.F., Beland, K.F., McCormick, S.D., 2001. Effects of acidity and aluminum on the physiology and migratory behavior of Atlantic salmon smolts in Maine, USA. *Water Air and Soil Pollution* 130(1-4):881-886
- Maltby, L., Clayton, S.A., Yu, H.X., McLoughlin, N., Wood, R.M., Yin, D.Q., 2000. Using single-species toxicity tests, community-level responses and toxicity identification evaluations to investigate effluent impacts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(1):151-157
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2008. Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi*, Seoane. *Science of the Total Environment* 402(1):29-35
- Marques, S.M., Gonçalves, F. e Pereira, R. *in press*. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in a Iberian green frogs (*Rana perezi*, Seoane) from an uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*
- Mason, C.F. 1996. *Biology of freshwater pollution – 3rd Edition*. Longman Group UK, Limited, Essex, UK.
- McDonald, D.G., Reader, J.P. e Dalziel, T.R.K., 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In: Morris, R., Taylor, E.W., Brown, D.J.A., Brown, J.A. (Eds.). *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, SEB Seminar Series \_34. Cambridge University Press, New York, pp. 221–242.

- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. e Wood, C.M., 2000a. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* 50: 245–256.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G. e Wood, C.M., 2000b. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology* 50: 231–243.
- ME - Ministério da Economia, 2001. Decreto-Lei nº 198-A/2001, de 6 de Julho. Diário da República. Suplemento. Número 155. I-Série A: 4084-(2) - 4084(7).
- Mesman, M., Critto, A., Torresan, S., Semenzin, E., Giove, S., Schouten, A.J., Rutgers, M., Marcomini, A., 2007. Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part I. A multi-criteria based system for the selection of ecotoxicological tests and ecological observations. *Science of the Total Environment* 379(1):16-33
- Morris, R., Taylor, E.W. e Brown, J.A., 1989. *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Society for Experimental Biology. Seminar Series (No. 34). Cambridge University press. Pp. 1-12.
- Neves, O., Magalhães, M.C.F. e Matias, M.J., 1997. Contribuição para o estudo da contaminação resultante da exploração e abandono da mina da Cunha Baixa. I. Águas superficiais e subterrâneas. *Actas X Semana de Geoquímica - IV Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa*, Braga. Portugal, 483-486.
- Neves, O. e Matias, M.J., 1999. A dispersão do urânio na área de influência da mina da Cunha Baixa. *Comunicações Tomo 84*. Instituto Geológico e Mineiro. Lisboa, Portugal.
- Neves, O., Abreu, M.M., Vicente, E.M., 2008. Uptake of uranium by lettuce (*Lactuca sativa* L.) in natural uranium contaminated soils in order to assess chemical risk for consumers. *Water Air and Soil Pollution* 195 (1-4): 73-84
- Nero, J.M.G., Dias, J.M.M., Pereira, A.J.S.C., Godinho, M.M., Neves, U.P.F. e Barbosa, S.V.T., 2003. Metodologia integrada para caracterização do cenário ambiental em minas de urânio desactivadas. *Actas do III Seminário de Recursos Geológicos, Ambiente e Ordenamento do Território*. Departamento de Geologia, UTAD, Vila Real, Portugal.

- OECD (1992). Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 203. OECD, Paris. Pp. 1-9.
- Peakall, D., 1992. Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman & Hall, London.
- Pereira, R., Ribeiro, R. e Gonçalves, F., 2004. Plan for an integrated human and environmental risk assessment in the S. Domingos mine area (Portugal). Hum Ecol Risk Assess 10:543-578.
- Pereira R., Sousa, J.P., Ribeiro, R. e Gonçalves, F., 2006. Microbial Indicators in Mine Soils (S. Domingos Mine, Portugal). Soil & Sediment Contamination 15: 147–167.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M. e Gonçalves, F., 2008a. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. The Science of the Total Environment. 390: 377–386.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Castro, B. e Gonçalves, F., 2008b. Contribution for Tier I of the Ecological Risk Assessment of Cunha Baixa Uranium Mine (Central Portugal): II Soil ecotoxicological screening. The Science of the Total Environment. 390:387–395.
- Poston, T.M., 1982. The bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 28: 682–690.
- Pyle, G.G., Swanson, S.M. e Lehmkühl, D.M., 2001. Toxicity of Uranium Mine-Receiving Waters to Caged Fathead Minnows, *Pimephales promelas*. Ecotoxicology and Environmental Safety 48(2): 202-214
- Ribeiro, C.A.D., Nathalie, M.D., Gonzalez, P., Yannick, D., Jean-Paul, B., Boudou, A. e Massabuau, J.C., 2008. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. Environmental Toxicology and Pharmacology 25(3): 304-309.
- Riethmuller, N., Markich, S.J., van Dam, R.A. e Parry, D., 2001. Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). Biomarkers 6: 45-51.
- Santo, J.C. e Freire, A P., 1983. Tratamento de minérios pobres na mina da Cunha Baixa. Boletim Minas 20(3): 139-145.

- 
- Scroggins, R., van Aggelen, G. e Schroeder, J., 2002. Monitoring sublethal toxicity in effluent under the metal mining EEM program. *Water Quality Research Journal of Canada* 37 (1): 279-294.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O. e Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79: 55-83.
- Suter, G.W. II., 2000. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Chelsea. MI. 1993, p.538
- Tomé, V.F., Rodriguez, P.B., Fernandez, M.P., Lozano, J.C., 2006. Linearity assumption in soil-to-plant transfer factors of natural uranium and radium in *Helianthus annuus* L. *Science of the Total Environment* 361(1-3):1-7
- Tkatcheva, V., Holopainen, I.J., Hyvarinen, H. e Kukkonen, V.K.J., 2007. The responses of rainbow trout gills to high lithium and potassium concentrations in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68(3): 419-425.
- USEPA, 1989. *National Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Volume 2: Risk Assessment and Fish Consumption Limits - Third Edition* p.1-61  
(Disponível em <http://www.epa.gov/waterscience/fish/advice/volume2/index.html>)
- USEPA, 1998. United States Environmental Protection Agency. *Guidelines for Ecological Risk Assessment*. EPA/630/R-95/002F, Risk Assessment Forum, Washington, DC, USA.
- USEPA, 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms- Fifth Edition*. EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Pp.266
- Van der Oost, R., Beyer, J. e Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149.
- Viadero, R.C. e Tierney Jr., E.A., 2003. Use of treated mine water for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture- a preliminary assessment. *Aquacultural Engineering* 29(1-2): 43-56.
- Weeks, J.M. e Comber, S.D.W., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineral Magazine* 69(5): 601-613.

Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C. e Xue, Y.Q., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 185–190.

Zar, J.H. (1996). *Biostatistical analysis*. 3rd Edition. New Jersey: Prentice-Hall International Inc.



## **Capítulo II. Avaliação da bioacumulação e da toxicidade sub-letal do urânio em *Carassius auratus* (L. 1758) (comportamento alimentar, e biomarcadores de stress oxidativo)**

### **Resumo**

O urânio é um metal com propriedades químicas e físicas únicas, muito utilizado tanto na obtenção de energia como em armamento nuclear. As explorações de urânio originaram resíduos enriquecidos com uma mistura complexa de metais e radionuclídeos, sendo o urânio um dos elementos de maior preocupação ambiental. A formação destes efluentes persiste no ambiente, mesmo após a cessação da actividade mineira, afectando quer as populações humanas vizinhas, quer os ecossistemas de água doce. Durante os últimos anos a comunidade científica tem focado a sua atenção nos potenciais perigos relacionados com a dispersão do urânio, especialmente o ião uranilo (espécie mais comum em meio aquoso) nos ecossistemas de água doce. De forma a testar a toxicidade do ião uranilo para a espécie *Carassius auratus* foi realizado um ensaio-sub-letal expondo os organismos, durante 96H, a diferentes concentrações de nitrato de uranilo. Os parâmetros avaliados foram: a bioacumulação de urânio no músculo do peixe, o comportamento alimentar, a actividade da enzima catalase e a peroxidação lipídica das células hepáticas. Os mesmos parâmetros foram analisados 48 e 96H após a exposição ter terminado. A bioacumulação de urânio, no músculo de *Carassius auratus* foi significativamente superior ( $P < 0.05$ ) nos organismos expostos às concentrações de 450 e 2025  $\mu\text{g L}^{-1}$ , relativamente ao controle. Contudo, não houve qualquer efeito significativo do tempo de exposição neste parâmetro. Os organismos provaram ainda ser capazes de depurar este elemento, durante o período de pós-exposição. Não obstante a bioacumulação de urânio, a percentagem de presas (*D. magna*) ingeridas pelos peixes aumentou significativamente, em relação ao controle, ao longo do tempo de pós-exposição ( $P < 0.05$ ), mas de forma independente das concentrações testadas. Não foi possível dosear catalase nos organismos expostos à concentração mais elevada de urânio (2025  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) o que poderá revelar a total inibição da actividade desta enzima. No entanto, a aparente inibição desta enzima, não se traduziu na peroxidação lipídica das células hepáticas, o que sugere que outros mecanismos de defesa antioxidante podem ter actuado



no sentido de evitar este efeito. O facto de a inibição da actividade da catalase ter ocorrido ao longo do período de pós-exposição, nos indivíduos do controlo, sugere que o manuseamento e alimentação dos organismos durante o período de pós-exposição pode igualmente induzir condições de stress oxidativo.

**Palavras-Chave:** Testes de toxicidade, Urânio, *Carassius auratus*, Biomarcadores, comportamento alimentar

## 1. Introdução

A exploração de minérios radioactivos constituiu uma actividade económica, particularmente significativa no Centro de Portugal (distritos da Guarda, Viseu e Coimbra), sobretudo na primeira metade do século passado, em função do envolvimento da Europa em duas guerras mundiais.

Os efluentes mineiros, derivados desta actividade, são normalmente ricos em metais, assim como noutros compostos inorgânicos e orgânicos que afectam a sua biodisponibilidade e toxicidade (Antunes et al., 2007). No que concerne aos efluentes provenientes de explorações de minério radioactivo, em particular, o urânio é um dos elementos de maior preocupação, sobretudo pela sua toxicidade química mas, também, pela toxicidade radiológica (Sheppard et al., 2005), resultante do seu decaimento numa série de elementos radioactivos, que termina com o chumbo, com a subsequente emissão de radiações (ASTDR, 1999). Como resultado da libertação destes efluentes nos sistemas de água doce, o urânio pela sua elevada mobilidade, pode estar presente nestes ambientes, numa grande variedade de formas solúveis, incluindo na forma de ião uranilo ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) dissolvido e de complexos de uranilo com compostos inorgânicos (sulfatos e carbonatos) e ligandos orgânicos (ácidos húmicos e fúlvicos) (Gascoyne, 1992 *in* Charles et al., 2003). O impacto deste elemento nos diferentes níveis tróficos dos sistemas de água doce tem sido reportado por alguns autores, nomeadamente em algas (e.g. Charles et al., 2002; Hogan et al., 2005), invertebrados (e.g. Poston et al., 1984; Labrot et al., 1999; Seeman et al., 2001; Peterson et al., 2002) e peixes (Cooley et al., 2002; Liber et al., 2004; Barillet et al., 2005). Adicionalmente alguns estudos testaram os efeitos do ião uranilo ( $\text{U}_{\text{VI}}\text{-UO}_2^{2+}$ ), em diferentes níveis de pH e de dureza da água. (Labrot et al., 1999; Franklin et al., 2000; Riethmuller et al., 2001; Charles et al., 2002; Hogan et al. 2005 ; Sheppard et al., 2005). Segundo estes estudos, a diminuição da toxicidade do U, varia inversamente com a diminuição do pH e directamente com o aumento da dureza da água, provavelmente devido à redução da entrada de  $\text{UO}_2^{2+}$ , nas membranas das células por competição com iões com maior afinidade para os canais iónicos (Riethmuller et al. 2001). A formação dos complexos de U, com ligandos inorgânicos (carbonatos, fosfatos ou iões hidroxilo) também diminui a sua toxicidade, devido à redução da sua biodisponibilidade (Fortin et al., 2004). Contudo, apesar da informação existente sobre a toxicidade aguda e crónica do

---

urânio nos organismos aquáticos, esta continua a ser muito limitada, dificultando por isso as avaliações de risco associadas à libertação de efluentes ricos neste elemento, nos sistemas de água doce.

Os peixes são alvos preferenciais de exposição aos tóxicos, dada a sua permanência na água, representando as brânquias a principal via de exposição, (McDonald et al., 1991). Estes organismos são também selecionados para estudos de bioacumulação de tóxicos, devido a, geralmente, se encontrarem no topo das cadeias alimentares, representando por isso as concentrações máximas biocumuladas no sistema aquático, e ainda porque são uma importante via de exposição para os seus predadores, incluindo seres humanos (Peterson et al., 2002). A biodisponibilidade dos metais para os peixes, depende não só dos factores extrínsecos, mas também da própria espécie.

Ao longo dos últimos anos, pequenos peixes de aquário foram utilizados no laboratório como modelos para estudar os mecanismos de acção de substâncias tóxicas, quer pela sensibilidade demonstrada, quer pela facilidade de obtenção e manutenção e finalmente pela sua posição nas cadeias alimentares (Hinton et al., 2005). *Carassius auratus*, é uma espécie pertencente à família *Cyprinidae*, frequente nas águas dos rios do Centro do País, que pela sua posição intermédia nas cadeias alimentares, poderá ter um papel importante no equilíbrio dos ecossistemas. Esta espécie mostrou ainda ser um bom modelo para estudos de Ecotoxicologia, dado que possui tolerância a condições extremas de temperatura e oxigénio, bem como a diferentes tóxicos (van den Thillart e van Waarde, 1985; Ford e Beitinger, 2005; Bagnyukova et al., 2006).

Os efeitos dos metais começam geralmente por se fazer sentir na forma de alterações subtis em parâmetros moleculares, que acabam por comprometer funções fisiológicas dos seres vivos, aumentando a sua susceptibilidade a outros agentes de *stress* e por último reduzindo o tempo de vida dos organismos (Barillet et al., 2005). Deste modo, em muitas situações, é vantajoso conjugar a avaliação de biomarcadores moleculares e enzimáticos com variáveis subletais mais abrangentes, como o crescimento ou as respostas comportamentais. Os parâmetros comportamentais (*e.g.*, actividade natatória, comportamento alimentar) são vistos como respostas ao nível do indivíduo, que integram numerosos processos bioquímicos e/ou fisiológicos (Peakall, 1992; Heath, 1995; Gerhardt, 1998). As respostas alimentares são normalmente consideradas como respostas comportamentais, mas os efeitos na alimentação têm consequências a outros níveis. A

depressão da actividade alimentar ou da taxa de ingestão tem implicações no balanço energético e, como consequência, podem registar-se efeitos nefastos no crescimento, reprodução ou até na sobrevivência dos indivíduos e, subsequentemente, ao nível da população ou da comunidade (Kumar e Chapman, 1998; Taylor *et al.*, 1998).

De forma a contribuir para aumentar a base de dados de informação toxicológica para espécies de água doce, o presente estudo teve como objectivo geral avaliar os efeitos sub-letais do ião uranilo ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) em peixes dulçaquícolas (*Carassius auratus*) sujeitos a uma exposição de 96h, assim como a sua capacidade de recuperação medindo parâmetros individuais e sub-individuais, nomeadamente: o comportamento alimentar, o teor de urânio bioacumulado no músculo, a actividade da catalase hepática e a peroxidação lípídica, através do doseamento de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (*do inglês*: TBARS *thiobarbituric acid reactive substances*, assim designado à frente), em três momentos após a exposição: 0, 48 e 96H.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Substância química**

O composto inorgânico nitrato de uranilo [ $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] foi adquirido à empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Imediatamente antes do início da experiência, foi preparada uma solução-mãe deste sal, através da sua dissolução em água doce reconstituída de elevada dureza (ASTM, 1980) (ver abaixo). A gama de concentrações a testar foi preparada por diluições subsequentes da solução-mãe, expressas em concentrações nominais do elemento U.

### **2.2. Organismos teste e condições de aclimação**

Os peixes utilizados no teste de toxicidade, pertencentes à espécie *Carassius auratus*, tinham entre 1.5-3.0 g de peso e 5-6 cm de comprimento, tendo sido obtidos num fornecedor local. Todos os peixes utilizados no ensaio provieram do mesmo lote. A aclimação às condições laboratoriais decorreu durante 2 semanas. Os organismos foram colocados em aquários de vidro contendo água doce reconstituída de elevada dureza ("hard

synthetic freshwater" *sensu* ASTM, 1980 e USEPA, 2002), com permanente arejamento. Este meio de cultura foi usado tendo em conta a preferência desta espécie por águas duras e ligeiramente alcalinas ( $\text{pH} \geq 8$ ), de acordo com informação dada pelo fornecedor. Todos os aquários foram equipados com um filtro e com arejamento contínuo e, mantidos à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de  $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{D}}$ . Os peixes foram alimentados *ad libitum*, três vezes por semana, com alimento para peixes de aquário (Tetramin<sup>®</sup> - Tetra, Melle, Alemanha). No intervalo de 48h que antecedeu o ensaio, não foi administrado qualquer alimento.

### 2.3. Condições experimentais

Os peixes foram expostos individualmente em recipientes de plástico com 3L de água reconstituída de elevada dureza (ver acima), respeitando a carga máxima de 1 g de peixe por litro, recomendada pela OECD (1992). As condições do ensaio (temperatura, fotoperíodo e arejamento) foram idênticas ao descrito acima para a fase de aclimação. Foi utilizado um desenho estático (sem mudanças de meio), expondo grupos de 16 peixes por concentração, durante 96h, a 4 níveis de exposição: nula ( $0 \mu\text{g U L}^{-1}$ ), reduzida ( $100 \mu\text{g U L}^{-1}$ ), intermédia ( $450 \mu\text{g U L}^{-1}$ ) e elevada ( $2025 \mu\text{g U L}^{-1}$ ). Este último valor foi definido como relevante apenas numa situação extrema, como a exposição a um efluente mineiro, dado que Antunes et al (2007) detectou valores máximos de U nessa ordem de grandeza ( $1800 \mu\text{g U L}^{-1}$ ) nas lagoas da mina de urânio da Cunha Baixa.

Após o término da exposição (T=0h) foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos e bioquímicos: a) comportamento alimentar; b) teor de urânio no músculo; c) actividade da catalase hepática; d) peroxidação lipídica do tecido hepático (através do doseamento de TBARS). Estes parâmetros foram quantificados em 4 peixes seleccionados aleatoriamente para cada concentração. Os restantes peixes foram transferidos para água doce reconstituída de elevada dureza (3L/peixe), de forma a avaliar a sua capacidade de depuração. A eficiência e rapidez de depuração foram avaliadas através da quantificação dos parâmetros acima indicados em 4 peixes seleccionados aleatoriamente por concentração de nitrato de urânio testada, dois momentos após ter terminado a exposição (T=48h e T=96h).

#### **2.4. Comportamento alimentar após a exposição**

Em cada momento de amostragem após exposição (T=0h, 48h e 96h) foi avaliado, de forma individualizada, o comportamento alimentar de 4 peixes, seleccionados aleatoriamente, por concentração testada. O ensaio de alimentação teve início com a adição de 10 cladóceros adultos (*Daphnia magna*), ao recipiente teste, onde foram homogeneamente dispersos com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Durante 2 minutos, foi monitorizado o comportamento de cada indivíduo através de observação directa, efectuada de forma discreta, de modo a que a presença do observador não alterasse o comportamento dos peixes. Para cada peixe foi registado o tempo decorrido entre o início do ensaio (adição do alimento) e a primeira investida alimentar bem sucedida (*i.e.*, investida em que ocorreu efectivamente ingestão), tendo sido contabilizado o nº total de indivíduos ingeridos durante dois minutos. No fim deste período, calculou-se a fracção de alimento ingerido ao fim dos 2 minutos de exposição (nº de dáfrias ingeridas/ total de dáfrias adicionadas).

#### **2.5. Bioacumulação de urânio no músculo**

Em cada momento de amostragem (T=0h, 48h e 96h) e após a realização do ensaio de comportamento alimentar, os organismos foram sacrificados e dissecados para remoção de filetes de músculo, sempre com o cuidado de não incluir fragmentos de osso. As amostras de músculo foram congeladas (-20°C) até ser possível o seu processamento. Após o descongelamento, à temperatura ambiente, as amostras foram secas na estufa a 105°C, até estabilização do peso. O peso de cada amostra foi determinado com uma precisão de 0,1mg. Posteriormente, para proceder à digestão húmida, a cada amostra foi adicionado 1 mL de ácido nítrico supra-puro, Merck® 65%. Para maximizar a solubilização, as amostras foram incubadas em frascos de teflon, em banho de areia quente a uma temperatura de 60°C, durante uma noite, após o que se adicionou, a cada amostra, 0,5 mL de peróxido de hidrogénio supra-puro Merck® 30%, para terminar a digestão dos resíduos. O volume de cada amostra foi transferido para frascos de polipropileno e diluído com água destilada até perfazer um volume de 5 mL. Os extractos foram posteriormente analisados por espectrometria de massa ICP (APHA-AWWA-WEF, 1995), para quantificar o teor de U no

músculo (expresso em  $\mu\text{g U g}^{-1}$  peso seco). Foram ainda preparados brancos, seguindo exactamente o mesmo procedimento descrito para a digestão das amostras.

## 2.6. Biomarcadores de stress e dano oxidativo

Aquando da dissecação dos peixes, em cada momento de amostragem, os fígados dos diferentes animais foram retirados e congelados individualmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras, após descongelação, foram homogeneizadas em tampão fosfato (50mM, pH=7 com Triton X-100, 0,1%) e centrifugadas a 10000g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi dividido em alíquotas, para posterior determinação da actividade da enzima catalase (CAT) e dos produtos de peroxidação lípidica (TBARS). A concentração de proteína das amostras foi determinada em triplicado por espectrofotometria (595 nm), de acordo com o método de Bradford (1976) adaptado para microplaca. Todos os biomarcadores foram expressos em função do conteúdo da amostra em proteína (ver abaixo).

A actividade da CAT foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984). Este método envolve a monitorização do consumo de peróxido de hidrogénio a um comprimento de onda de 240nm ( $\epsilon=0,0394\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), durante um período de 30 seg. A actividade da CAT foi expressa em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína.

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação de TBARS de acordo com o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). Esta metodologia baseia-se na reacção da peroxidação lipídica, na qual o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é decomposto nos seus produtos de reacção, como o MDA (malondialdeído). A quantidade de TBARS é então medida por espectrofotometria, a 535nm ( $\epsilon=156\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), e expressa em nmol de MDA equivalentes por mg de proteína.

## 2.7. Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados referentes à quantificação dos biomarcadores de stress oxidativo, e ao teor em urânio no tecido muscular foi realizada uma análise de variância (ANOVA) bifactorial, utilizando como factores o momento de amostragem (T=0h, 48h e 96h) e a concentração de U (0, 100, 450 e 2025  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a que os organismos estiveram expostos. Os dados foram transformados pela equação  $x^2=\log(x+1)$ ,

antes do tratamento estatístico, por forma a garantir os pressupostos deste teste paramétrico. No caso do comportamento alimentar (fracção de alimento ingerido), os dados foram transformados pela equação:  $x^2 = \arcsen x$  (Zar, 1996). Por forma a discriminar as diferenças entre os animais expostos e os não expostos (grupo controlo), realizou-se um teste de Dunnett, sempre que a concentração de U foi uma fonte de variação significativa na ANOVA. O nível de significância utilizado em todas as análises foi 0,05.

### 3. Resultados

A bioacumulação de urânio no músculo dos indivíduos da espécie *Carassius auratus* foi significativamente diferente em função da concentração à qual estiveram expostos ( $F=20,16$ ; d.f.=3,34;  $p<0,001$ ). Os organismos expostos às concentrações de  $450\mu\text{g L}^{-1}$  e de  $2025\mu\text{g L}^{-1}$  acumularam teores significativamente mais elevados de urânio no músculo, do que os indivíduos do controlo (teste de Dunnett:  $p<0,05$ ). Ainda que se possa observar uma redução nos níveis de urânio acumulados no músculo após 48H de exposição, sobretudo para os organismos expostos às concentrações de 100 e  $2025\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig.1), verifica-se que o tempo não teve qualquer efeito significativo neste parâmetro ( $F=2,20$ ; d.f.=2,34;  $p=0,126$ ), assim como a interacção entre os dois factores testados também não foi significativa ( $F=1,27$ ; d.f.=6,34;  $p=0,296$ ) (Fig.1).



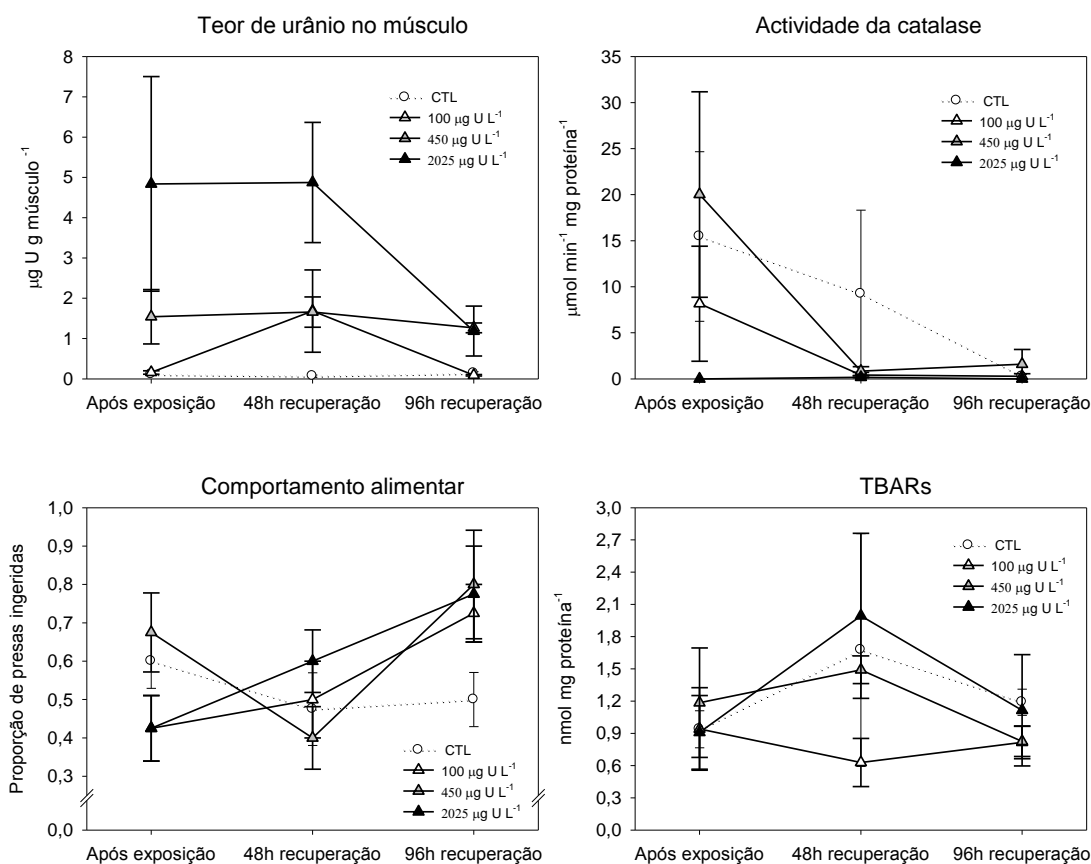


Figura 1 - Variação dos diferentes parâmetros avaliados ao nível do indivíduo e ao nível molecular, na espécie *Carassius auratus* após exposição a diferentes concentrações de nitrato de urânio (0, 100, 450 e 2025µg/l) . As barras correspondem ao desvio padrão.

Não obstante a bioacumulação significativa de urânio, nos indivíduos expostos a diferentes concentrações de nitrato de urânio, este factor não teve qualquer efeito significativo no comportamento dos indivíduos, avaliado em termos da proporção de presas ingeridas ( $F=1,13$ ; d.f.3,36;  $p=0,351$ ). Este parâmetro sofreu um efeito significativo do factor tempo ( $F=6,36$ ; d.f.=2,36;  $p=0,004$ ), na medida em que 96H após a exposição ao nitrato de urânio ter cessado, a proporção de presas ingeridas pelos peixes difere significativamente da registada às 0H, independentemente da concentração de nitrato de urânio testada (interacção entre os dois factores não significativa). Nos peixes expostos às concentrações mais elevadas (450 e 2025µg L<sup>-1</sup>), a proporção de presas ingeridas aumentou, 96H após a exposição ao nitrato de urânio ter terminado (Fig. 1).

O tempo que os peixes demoraram a ingerir a primeira presa (*D. magna*) não sofreu qualquer variação significativa em função do tempo de recuperação e da concentração de nitrato de urânio a que os organismos estiveram expostos ( $F=0,75$ ; d.f.=2,36;  $p=0,479$  e  $F=1,92$ ; d.f.=3,36;  $p=0,144$ , respectivamente).

Os níveis de TBARS encontrados, no fígado dos indivíduos expostos, às diferentes concentrações de nitrato de urânio, não sofreram qualquer variação significativa ( $F=1,39$ ; d.f.=3,36;  $p=0,262$ ). Para este parâmetro não se encontraram igualmente variações significativas ao longo do tempo de recuperação ( $F=0,79$ ; d.f.=2,36;  $p=0,464$ ). No entanto o factor tempo influenciou significativamente a actividade da enzima catalase ( $F=7,65$ ; d.f.=2,36;  $p=0,002$ ) mas de modo independente das concentrações de nitrato de urânio testadas [interacção entre os dois factores não significativa ( $F= 1,19$ ; d.f.=6  $P= 0,332$ )]. De facto às 48 e 96H de recuperação, após a exposição ao nitrato de urânio, verificou-se que a actividade da catalase, no fígado dos peixes, diminuiu significativamente (teste de Dunnett:  $p<0,05$  e  $p<0,01$ , respectivamente). Este parâmetro também mostrou variações significativas para as diferentes concentrações de nitrato de urânio a que os organismos estiveram expostos ( $F= 3,33$ ; d.f.=3,36  $P= 0,03$ ). Nos peixes expostos à concentração mais elevada ( $2025\mu\text{g L}^{-1}$ ) não foi possível medir a actividade da enzima catalase, em todos os organismos expostos, independentemente do tempo, tendo essa actividade sido significativamente inferior (teste de Dunnett:  $p<0,05$ ) aos valores obtidos no controle.

#### 4. Discussão

A existência de dados ecotoxicológicos para uma vasta gama de espécies aquáticas é crucial para prever os riscos associados à libertação de efluentes mineiros, ricos em urânio, em ecossistemas aquáticos. Adicionalmente, e uma vez que estas ocorrências são frequentemente episódicas, é importante perceber até que ponto os efeitos induzidos nas espécies de água doce são reversíveis, uma vez cessada a exposição.

Até à data existem poucos dados relativos à toxicidade sub-letal do urânio no biota dos ecossistemas de água doce (Poston et al., 1984; Franklin et al., 2000; Seeman et al., 2000; Kuhne et al., 2002; Hogan et al., 2005. Sheppard et al., 2005; Barillet et al., 2007), o que reforça a necessidade de investigação especializada nesta área. Deste modo a disponibilidade de ferramentas padronizadas, devidamente validadas para avaliação dos

---

efeitos químicos/radiológicos, ao nível celular, constitui igualmente um importante objectivo a ser atingido.

As brânquias e o fígado (Barillet et al., 2007) e, em menor escala, os ossos, as escamas, o intestino, os rins e as gónadas (Cooley e Klaverkamp, 2000; Barillet et al., 2007) têm sido referidos como órgãos com propensão para acumular urânio fornecido quer por via aquosa, quer através da dieta alimentar. O nosso estudo evidencia também a bioacumulação de urânio no músculo de *Carassius auratus*, após uma exposição de 96h a uma solução do ião uranilo ( $\text{UO}_2^{2+}$ ), sobretudo nas concentrações 450 e 2025  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Contudo este tecido demonstrou, igualmente, ser capaz de depurar o urânio, até níveis registados no controle, 96h após a exposição ter terminado. Esta capacidade de acumular e depurar urânio foi também demonstrada por outros autores em moluscos e peixes, como os pertencentes à espécie *Brachidanio rerio*, expostos a uma concentração ambientalmente relevante de 151  $\mu\text{g L}^{-1}$  de urânio (Labrot et al., 1999).

A bioacumulação de urânio, no tecido muscular de *Carassius auratus*, pareceu não ser capaz de induzir perturbações no comportamento alimentar dos organismos teste, uma vez que não foram registadas diferenças significativas, em termos da proporção de presas ingeridas pelos animais, após 96h de exposição, às diferentes concentrações do ião uranilo testadas. Esta observação está em concordância com a de Liber et al. (2004) uma vez que estes autores também não registaram alimento não consumido, depositado no fundo dos recipientes onde os peixes da espécie *Catostomus commersoni* estiveram expostos a não ser nos expostos a 6400  $\mu\text{g L}^{-1}$  de urânio. Contudo, embora não se tenham registado diferenças significativas entre o comportamento alimentar dos peixes expostos às diferentes concentrações testadas, após o período de pós-exposição descrito, foi possível observar um aparente aumento deste parâmetro na concentração mais elevada, sugerindo uma possível recuperação do comportamento. Assim, e apesar do mecanismo subjacente ao decréscimo no interesse dos peixes pelo alimento ser pouco claro, alguns autores que observaram inibição na alimentação induzida por metais levantaram a hipótese de ser a através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela debilitação da função neuronal e neuromuscular, que o comportamento alimentar dos peixes possa ser afectado (Jensen et al., 1997; Kumar e Chapman, 1998; Beauvais et al., 2000; Brewer et al., 2001; Castro et al., 2004). Contudo, e contradizendo outros autores (Castro et al., 2004; Wilding e Maltby, 2006; Pestana et al., 2007), que reportaram os efeitos de exposições de

organismos de água doce a metais, o comportamento alimentar pós-exposição provou não ser um parâmetro sensível para avaliar os efeitos adversos produzidos pela exposição ao urânio, pelo menos dentro das concentrações testadas, por via aquosa. Sendo que se destaca uma vez mais que a concentração mais elevada, testada neste estudo, corresponde ao cenário de exposição a um efluente mineiro.

Apesar da sua dupla natureza química e radiológica, os estudos existentes indicam que o urânio exerce os seus efeitos no biota aquático, sobretudo através de processos químicos que envolvem a activação de espécies reactivas de oxigénio (Yazzie et al., 2003; Linares et al., 2006; Pourahmad et al., 2006; Zeman et al., 2008). De facto tal como foi possível observar neste estudo a internalização de urânio em *Carassius auratus* foi capaz de induzir perturbações no sistema oxidativo do fígado dos peixes, tal como foi demonstrado pela inibição, aparentemente irreversível, da actividade da enzima catalase, que persistiu durante todo o período de recuperação. Esta observação foi consistente com as de outros autores que reportaram a inibição da enzima catalase, em tecidos de peixes, após a exposição a metais (Buet et al., 2004; Zhang, 2005; Ahmad et al., 2006; Vutukuru et al. 2006; Hansen et al., 2007). Barillet e colaboradores (2007), em particular mostraram uma redução significativa na actividade da catalase hepática de *Danio rerio*, após dez dias de exposição a 100 µg DU L<sup>-1</sup>. Embora o mecanismo de inibição desta enzima seja desconhecido, os iões uranilo, assim como outros metais, são conhecidos pela sua capacidade de se ligarem a grupos –SH, formando complexos com diferentes proteínas (Atli e Cani, 2007; Lombardi et al. in Hartsock et al., 2007), comprometendo muito provavelmente a sua actividade. Uma vez que a catalase é responsável pela degradação do peróxido de hidrogénio (derivado da actividade fisiológica catalítica da superóxido dismutase) é provável que ocorra a acumulação desta substância no citoplasma da célula. Contudo, isto foi em parte contrariado pelo facto de não se ter registado a ocorrência de peroxidação lípidica no fígado de *Carassius auratus*, tal como foi demonstrado pela ausência de diferenças significativas nos níveis de TBARS detectados nos organismos expostos às diferentes concentrações de urânio e os do controlo. Do mesmo modo também não foram registadas diferenças entre os tempos de pós-exposição avaliados, pelo que outras defesas de stress oxidativo, como a enzima glutatona peroxidase hepática (GPx), podem ter sido induzidas pelo peróxido de hidrogénio (Ahmad et al., 2006), evitando deste modo a peroxidação lípidica do fígado dos peixes. A enzima GPx pode ter exercido o seu

papel fisiológico protector, degradando elevadas concentrações de peróxido de hidrogénio, sendo oxidada durante este processo, perdendo subsequentemente a sua actividade. A glutathiona (na sua forma reduzida – GSH) é também um antioxidante intracelular, que impede a formação de espécies reactivas de oxigénio e subsequentemente a peroxidação lipídica (Pourahmad et al., 2006). De facto Bagnyukova e colaboradores (2006a-b) demonstraram que a inibição da catalase, em peixes da espécie *Carassius auratus* sob stress oxidativo, resultou em alterações compensatórias na actividade de enzimas antioxidantes dependentes da glutathiona.

A ausência de peroxidação lipídica nas membranas celulares e sub-celulares não esteve igualmente em concordância com as observações feitas por outros autores que referiram esta ocorrência como uma resposta ao stress oxidativo induzido pelo urânio (Cooley et al., 2000; Pourahmad et al., 2006). Contudo, estes autores apenas reportaram uma concentração significativa de peróxidos lipídicos no soro de peixes da espécie *Coregonus clupeaformis*, após 30 dias de exposição a uma concentração de  $100 \mu\text{g U g}^{-1}$  de alimento. Deste modo é possível que um período de exposição, ao urânio, tão curto (96h), não seja suficiente para induzir respostas oxidativas significativas em *Carassius auratus*, assim como em outras espécies com sensibilidade semelhante. De facto, Gioda et al. (2007), só verificaram um aumento significativo na quantificação de TBARS, em fígado de *Leporinus obtusidens*, após 45 ou 30 dias de exposição a zinco ( $2,3\text{mg L}^{-1}$  ou  $4,6\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente).

## 5. Conclusão

It

É já sobejamente reconhecida a dificuldade existente na extrapolação de efeitos observados em laboratório, resultantes de exposições a compostos individuais, para efeitos registados *in situ*, derivados de exposições a misturas complexas de metais. Contudo, é extremamente importante que conheçamos o papel dos contaminantes mais preocupantes no desenvolvimento de efeitos adversos, em diferentes níveis de organização biológica, antes de termos a capacidade de perceber e prever potenciais efeitos sinérgicos e antagonísticos resultantes da exposição a misturas.

A espécie *Carassius auratus* revelou ser um bom organismo-teste para a monitorização da contaminação de ambientes aquáticos com urânio, uma vez que

bioacumula este metal no músculo, um tecido disponível em maior quantidade, um aspecto particularmente importante em organismos de pequenas dimensões. Contudo, contrariando outros autores, o comportamento alimentar não revelou ser um parâmetro sensível nesta espécie, para avaliar a exposição ao elemento químico em estudo, na medida em que não se registaram diferenças significativas no número médio das presas ingeridas, em função das concentrações.

Os nossos resultados sugerem ainda que outras defesas antioxidantes, além da catalase, a qual foi inibida, podem ter evitado a peroxidação lipídica das células hepáticas. Apesar da depuração do urânio acumulado no músculo, ao longo do tempo de pós-exposição avaliado, a inibição da actividade da catalase, sugere que o sistema de stress oxidativo permanece afectado no período de pós-exposição, mesmo em animais controlo. A alimentação de animais durante este período pode ter contribuído para induzir condições de stress oxidativo. Deste modo prevê-se a realização de estudos que permitam perceber a contribuição da alimentação, temperatura, estimulação mecânica e visual, e a presença de predadores na indução de stress oxidativo em peixes de água doce.

---

**Bibliografia**

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126. American Public Health Association, Washington DC.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A. (2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an *in situ* study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65: 952-962.
- Antunes, S.C., Pereira, R. e Gonçalves, F. (2007). Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(2): 207-213.
- APHA, (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th Edition USA. Pp. 811-867.
- ASTM (1980). *Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macro invertebrates and amphibians*. Report E 729-80. American Society for Testing and Materilas, Philadelphia, USA
- ATSDR (1999). *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for uranium*. U.S. Department of health and human services. Pp. 462.
- Atli, G., Canli, M. (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 145(2): 282-287.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A. (2007). Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(3): 497-505.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C. e Devaux, A. (2005). Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Suppl.* 1, 40(1): S175-S181.
- Bagnyukova, T.V. e Lushchak V.I. (2006a). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology c-toxicology & Pharmacology* 143 (1): 30-35.
- Bagnyukova, T.V. e Lushchak V.I. (2006b). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology c-toxicology & Pharmacology* 143 (1): 36-41

- Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P. e Lushchak, V.I. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to Arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 658-665
- Beauvais, S.L., Jones, S.B., Brewer, S.K., Little, E.E. (2000). Physiological measures of neurotoxicity of diazon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1875-1880.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brewer, S.K., Little, E.E., DeLonay, A.J., Beauvais, S.L., Jones, S.B., Ellersieck, M.R. (2001). Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 70-76.
- Buet, A., Roche, H., Ramade, F. (2004). Ecotoxicological research on the contamination of fish communities in the Regional Natural Reserve of Camargue by persistent organic pollutants. *Revue d'écologie-la terre et la vie* 59(1-2):101-111.
- Castro, B., Sobral O., Guilhermino, L., Ribeiro, R. (2004). An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13: 667-681.
- Charles, A.L., Markich, S.J., Stauber, J.L., De Filippis, L.F. (2002). The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chorella* sp.). *Aquatic Toxicology* 60: 61-73.
- Cooley, H.M. e Klaverkamp, J.F. (2000). Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48: 375-392.
- Cooley, H.M., Evans, R.E., Klaverkamp, J.F. (2000). Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48: 495-515.
- Cooley, H.M., Evans, R.E., Klaverkamp, J.F. (2002). Baseline measurements of indicators for sublethal effects of metals in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43(4):418-424.



- 
- EEC (1992). Acute toxicity to fish. Seventh amendment of directive 67/548/EEC, Annex V - Part C: Methods for the determination of ecotoxicity. Directive 92/32/EEC. EEC.
- Ford, T. e Beitinger, T.L. (2005). Temperature tolerance in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Thermal Biology* 30 (2): 147-152.
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J. (2004). Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 974-981.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Markich, S.J., Lim, R.P. (2000). pH- dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology* 48: 275-289.
- Gascoyne, M. (1992). Geochemistry of the actinides and their daughters. In: Ivanovich, M., Harmon, R.S. (Eds.), *Uranium Series Disequilibrium: Applications to Earth, Marine and Environmental Sciences*, second ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 34–61.
- Gerhardt, A. (1998). Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792): survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35:309-316.
- Glantz, S.A. (1997). *Primer of biostatistics – 4th Edition*. McGraw-Hill, USA.
- Gioda, C.R., Lissner, L.A., Pretto, A., da Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J.R., Morsch, V.M. e Loro, V.L. (2007). Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere* 69(1): 170-175.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 32: 727-738.
- Hartsock, W.J., Cohen, J.D., Segal, D.J. (2007). Uranyl acetate as a direct inhibitor of DNA-binding proteins. *Chemical Research in Toxicology* 20: 784-789.
- Hansen, B.H., Rømme, S., Garmo, Ø.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A. (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67: 2241-2249.
-

- Heath, A.G. (1995). Water pollution and fish physiology – 2nd Edition. CRC Press, Inc., USA.
- Hinton, E.D., Kullman, S.W., Hardman, R.C., Volz, D.C., Chen, P.J., Carney, M. e Bencic, D.C. (2005). Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12): 635-648.
- Hogan, A.C., van Dam, R.A., Markich, S.J., Camilleri, C. (2005). Chronic toxicity of uranium to a tropical green alga (*Chlorella* sp.) in natural waters and the influence of dissolved organic carbon. *Aquatic Toxicology* 75: 343-353.
- Jensen, C.S., Garsdal, L., Baatrup, E. (1997). Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1727-1732.
- Kerr, J.B. (1999). Atlas of functional histology. London: Mosby International.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S. (2002). Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(10): 2198-2203.
- Kumar, A., Chapman, J.C. (1998). Profenofos toxicity to the eastern rainbow fish (*Melanotaenia duboulayi*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1799-1806.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F. (1996). *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetyl-cholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian. *Species Biomarkers* 1: 21-28
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Saint Denis, M., Ribera, D. (1999). Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36(2): 167-178.
- Liber, K., Stoughton, S., Rosaasen, A. (2004). Chronic uranium toxicity to white sucker fry (*Catostomus commersoni*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73(6): 1065-1071.

- 
- Linares, V., Belles, M., Albina, M.L., Sirvent, J.J., Sanchez, D.J., Domingo, J.L. (2006). Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicology Letters* 167(2):152-161
- McDonald, D.G., Reader, J.P. e Dalziel, T.R.K. (1989). The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In: Morris, R., Taylor, E.W., Brown, D.J.A., Brown, J.A. (Eds.). *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, SEB Seminar Series \_34. Cambridge University Press, New York, pp. 221–242.
- McDonald, D.G., Cavdek, V. e Ellis, R.(1991). Gill design in freshwater fishes: interrelationships among gas exchange, ion regulation and acid–base regulation, *Physiol. Zool.* 64:103–123.
- OECD (1992). Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 203. OECD, Paris. Pp. 1-9.
- Peakall, D. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman & Hall, London.
- Peterson, M.J., Smith, J.G., Southworth, G.R., Ryon M.G., Eddlemon, G.K. (2002). Trace element contamination in benthic macroinvertebrates from a small stream near a uranium mill tailing site. *Environmental Monitoring and Assessment* 74: 193-208.
- Pestana, J.L.T., Ré, A., Nogueira, A.J.A. e Soares, A. M. V. M. (2007). Effects of Cadmium and Zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda) *Chemosphere* 68 (8): 1556-1562
- Poston, T.M., Hanf Jr., R.W., Simmons, M.A. (1984). Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water Air and Soil Pollution* 22: 289-298.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehadi, H.A., Ghalandri, R. (2006). A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environmental Toxicology* 21: 349-354.
- Reflection Paper on Residues in foodstuffs of animal origin. European Commission, Enterprise Directorate-General, Health and Consumer Protection Directorate-General (2003).
- Riethmuller, N., Markich, S.J., van Dam, R.A., Parry, D. (2001). Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). *Biomarkers* 6:45-51.

- Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., Narbonne, J.F. (1996). Uranium in the environment: occurrence, transfer and biological effects. *Rev Environ Contam Toxicol* 146:53–89
- Semaan, M., Holdway, D.A., van Dam, R.A. (2001). Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environmental Toxicology* 16: 365-376.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79: 55-83.
- Taylor, S.L., Bart, H.L., Martinat, P.J., Abdelghani, A., Tchounwou, P.B. (1998). Influence of taxonomy, ecology, and seasonality in river stage fish contamination risks in floodplain swamps of the lower Mississippi river. *Ecotoxicology* 7(6): 325-334
- USEPA (2002). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving waters to Freshwater and Marine Organisms- Fifth Edition*. EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Pp.266
- van den Thillart, G., van Waarde, A. (1985). Teleosts in hypoxia: Aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.* 8:393–409.
- Vutukuru, S.S., Chintada, S., Madhavi, K.R., Rao, J.V., Anjaneyulu, Y. (2006). Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 32 (3): 221-229.
- Vutukuru, S.S., Chintada, S., Madhavi, K.R., Pauleeana, J.S., Rao, J.V., Anjaneyulu, Y.(2005).Studies on the development of potential biomarkers for rapid assessment of cooper toxicity to freshwater fish using *Esomus danricus* as model. *International Journal of Environment Research and Public Health* 2(1): 63-73.
- Waiwood, K.G., Beamish, W.H. (1978). The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology* 13:591-598.
- Wilding, J., Maltby, L. (2006). Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (7): 1795-1801.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Stearns, D.M. (2003). Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chemical Research in Toxicology* 16: 524-530.

- Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q. (2005). Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 185–190
- Zar, J.H. (1996). *Biostatistical analysis*. 3rd Edition. New Jersey: Prentice-Hall International Inc.
- Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J., Aliaume, C. (2008). Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 86: 370-378.



## Conclusão Geral

De acordo com a Análise de Risco Ecológico em curso, para a mina da Cunha Baixa, foi feita a caracterização química do compartimento aquático (Antunes et al., 2007) e terrestre (Pereira et al, 2008) e foram efectuados estudos ecotoxicológicos dos efeitos do efluente mineiro, antes e após o tratamento químico, em algas, invertebrados (Antunes et al, 2007) e anfíbios (Marques et al, 2008). Impunha-se a necessidade de avaliar os efeitos letais e sub-letais ao nível dos peixes, de forma a complementar a informação para os diferentes níveis tróficos. Assim, de acordo com os procedimentos padronizados pela OECD (1992), determinou-se um  $EC_{50}$  para as 24, 48 e 96 horas de exposição, utilizando a espécie *Carassius auratus* e avaliando o parâmetro mortalidade. De acordo com os valores determinados  $EC_{50-24h} = 82,90\%$  ( $IC_{95\%} = 75,2- 94,8$ ),  $EC_{50-48h} = 78,20\%$  ( $IC_{95\%} = 78,2- 86,2$ ) e  $EC_{50-96h} = 76,6\%$  ( $IC_{95\%} = 75,9- 77,3$ ), para os diferentes períodos de exposição, ao efluente com o pH ajustado para um valor próximo da neutralidade, podemos considerar que o efluente apresenta uma toxicidade aguda, reduzida para a espécie em causa. Por outro lado, quando os organismos foram expostos ao efluente não diluído, com pH ajustado para um valor próximo da neutralidade, não se registou mortalidade, pelo que se pode concluir que a acidez tem um papel preponderante na toxicidade do efluente. Deste modo, prevê-se que a libertação do mesmo em sistemas aquáticos adjacentes, que tenham um poder tamponizante e de diluição significativo, não irá dar origem a efeitos agudos, na comunidade ictioplanctónica, caso as espécies presentes tenham sensibilidades semelhantes a *Carassius auratus*. Contudo, poder-se-ão esperar efeitos indirectos, na medida em que o efluente demonstrou uma toxicidade mais elevada para níveis inferiores da cadeia trófica.

Sendo o urânio um dos elementos mais preocupantes, presentes no efluente da mina da Cunha Baixa, e pelo facto de existir pouca informação sobre os efeitos sub-letais induzidos por este elemento, em espécies de água doce, no segundo capítulo procurou-se avaliar a toxicidade sub-letal do urânio, utilizando uma vez mais a espécie *Carassius auratus* e avaliando parâmetros individuais (comportamento alimentar) e sub-individuais (actividade da catalase hepática e peroxidação lipídica das células hepáticas-TBARS). A gama de concentrações testada (0, 100, 450 e 2025  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi definida de forma a incluir uma concentração próxima de 1800  $\mu\text{g L}^{-1}$ , registada por Antunes et al. (2007), no efluente

da mina da Cunha Baixa e correspondendo por isso ao pior cenário de exposição directa ao efluente de uma mina de urânio. *Carassius auratus* revelou uma significativa capacidade de bioacumular urânio no músculo, após 96h de exposição às concentrações testadas mais elevadas, assim como de o eliminar, no período de pós exposição considerado. Não obstante a bioacumulação de urânio, não se registaram alterações significativas no comportamento alimentar da espécie, pelo que ao contrário do demonstrado por outros autores, este parâmetro demonstrou ser pouco sensível a exposições sub-letais a urânio, pelo menos para a espécie utilizada neste estudo. No que se refere aos parâmetros de stress oxidativo, a actividade da enzima catalase foi claramente inibida no período de pós-exposição. No entanto, tal facto não se traduziu na peroxidação lipídica das células hepáticas. De acordo com outros trabalhos (Zhang et al. 2005; Bagnyukova et al. 2007) a enzima catalase parece ser a menos importante no papel de destoxificação relativamente a outras enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo, nomeadamente a GPx, GST e GR. A inibição desta enzima pode ter ocorrido por ligação do urânio a grupos -SH. Contudo, outros mecanismos podem ter sido activados, impedindo o stress oxidativo das células hepáticas. Por outro lado, e uma vez que o mesmo se registou para os organismos do controlo, durante o período de pós-exposição, não se pode ignorar a possibilidade de o manuseamento e alimentação dos peixes durante este período ter afectado os organismos, induzindo condições de stress oxidativo.

Adicionalmente, e dadas as propriedades químicas do urânio, para avaliar a toxicidade deste elemento será importante utilizar tanto biomarcadores de stress oxidativo como biomarcadores de genotoxicidade aliados a efeitos histopatológicos e parâmetros comportamentais como actividade natatória e comportamento alimentar, pois as alterações ao nível do individuo têm por base alterações celulares e biomoleculares e reflectem-se ao nível da população e do ecossistema. De qualquer modo, e com base nos resultados obtidos sugerimos que esta avaliação seja feita para períodos de exposição superiores.



**Bibliografia**

- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F. (2007). Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(2): 207-213.
- Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P. e Lushchak, V.I. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in Response to short-term exposure to Arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 658-665
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R. (2008). Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Science of the Total Environment* 402(1):29-35
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R. (in press). Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in a iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from an uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*.
- OECD (1992). Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 203. OECD, Paris. Pp. 1-9.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M., Gonçalves, F. (2008). Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I. Soil chemical characterization. *The Science of the Total Environment*. 390:377–86.
- Zhang, J.F., Liu, H., Sun Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q. (2005). Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 185–190