

Avaliação dos efeitos de um pesticida na atividade comportamental de uma espécie nativa, o barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*), num sistema de mesocosmos

Inês Margarida Lopes Vieira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente

Orientadores: Doutor José Maria Horta e Costa Silva Santos

Doutor Paulo José de Lemos Branco

Júri:

Presidente: Doutora Rita do Amaral Fragoso, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor José Maria Horta e Costa Silva Santos, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;
Doutora Carla Sousa Santos, Investigadora do ISPA - Instituto Universitário de Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor José Maria Santos e Doutor Paulo Branco pela orientação, disponibilidade constante e apoio ao longo de todo o trabalho. Um obrigado especial também à Professora Teresa Ferreira pela ajuda na escolha do tema e à Professora Emília, que me deu a conhecer o inseticida escolhido para realizar a minha dissertação.

À Margarida Oliveira, obrigada pelo companheirismo nestes meses tão importantes para ambas.

À minha irmã, Joana Vieira, que é tudo para mim e que me apoiou incondicionalmente nesta fase tão importante.

À minha mãe, Ana Cristina Vieira e ao meu pai, Agostinho Vieira, por todos os sacrifícios que fizeram para eu conseguir realizar mais uma etapa na minha vida.

Ao Valter Reis, por ser o meu braço direito nos últimos cinco anos e me apoiar como ninguém.

À Salomé Oliveira que caminha comigo desde os 3 anos de idade e que viveu esta experiência comigo.

Aos meus amigos de Ourém, “As 5” e “Ourém é perto de Fátima”, que estiveram presentes nesta caminhada e que fazem parte da minha vida.

E por fim, aos meus amigos de Lisboa, que se demonstraram sempre entusiasmados pelas minhas conquistas. Um agradecimento especial à Laura Abreu, Rita Caseiro e Tatiana Máximo.

Resumo

O uso excessivo de pesticidas acarreta riscos muito grandes para o ambiente e sobretudo para os ecossistemas aquáticos, acabando por afetar negativamente os peixes de água doce e influenciar o seu comportamento. Contudo, poucos são os trabalhos conhecidos que se foquem nos efeitos sub-letais destes contaminantes, sobretudo em ciprinídeos que constituem a família piscícola mais abundante em rios Ibéricos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade comportamental de uma espécie ciprinícola nativa, o barbo-comum (*Luciobarbus bocagei* Steindachner, 1864), previamente exposto (2 horas) a diferentes concentrações de um pesticida, o inseticida piretróide esfenvalerato: 0,0 µg/L (controlo, i.e. sem inseticida); 1,2 µg/L (concentração baixa) e 2 µg/L (concentração alta). Os parâmetros comportamentais avaliados incluíram a atividade de rotina, a coesão de cardume e a ousadia, tendo sido monitorizados num sistema de mesocosmos. Foram detetadas alterações no comportamento de barbo-comum ao nível da atividade de rotina, em que se observou um acréscimo significativo da proporção de tempo passado em letargia, do controlo (25,23%) para a concentração alta (44,87%). Foram igualmente detetadas alterações comportamentais ao nível da ousadia, medida pela proporção de tentativas feitas para transpor a rampa de montante, significativamente maior nas situações controlo (37,43%) e de prévia exposição à concentração alta (41,52%), relativamente à concentração baixa (21,05%). Em relação à coesão de cardume, não foram observadas diferenças significativas após prévia exposição às diferentes concentrações de piteróide esfenvalerato. O presente trabalho demonstrou que mesmo uma exposição de curta duração ao piretróide esfenvalerato foi suficiente para alterar o comportamento de uma espécie piscícola nativa, com implicações ecológicas a diferentes níveis. São sugeridas implicações destes resultados para a gestão e apontadas futuras linhas de investigação.

Palavras-chave: peixe de água doce, inseticida, comportamento, atividade, poluição.

Abstract

Excessive use of pesticides poses very important risks to the environment and especially to aquatic ecosystems, negatively affecting freshwater fish and influencing their behavior. However, few works are known that focus on the sub-lethal effects of these contaminants, especially on cyprinids that constitute the most abundant fish family in Iberian rivers. The aim of this study was to evaluate the behavioral activity of a native cyprinid species, the Iberian barbel (*Luciobarbus bocagei* Steindachner, 1864), previously exposed (2 hours) to different concentrations of a pesticide, the pyrethroid insecticide esfenvalerate: 0.0 µg/L (control, i.e. without insecticide); 1.2 µg/L (low concentration) and 2 µg/L (high concentration). The behavioral parameters evaluated included routine activity, shoal cohesion and boldness, and were monitored in a mesocosm system. Changes in Iberian barbel behavior were detected at the level of routine activity, in which there was a significant increase in the proportion of time spent in lethargy, from the control (25.23%) to the high concentration (44.87%). Behavioral changes were also detected in terms of boldness, measured by the proportion of attempts made to cross the upstream ramp, which was significantly higher in control situations (37.43%) and in fish previously exposed to high concentration (41.52%), compared to low concentration ones (21.05%). In relation to shoal cohesion, no significant differences were observed after previous exposure to different concentrations of the pyrethroid esfenvalerate. The present study demonstrated that even a short-term exposure to the pyrethroid esfenvalerate was sufficient to change the behavior of a native fish species, with ecological implications at different levels. Inferences of these results for management are suggested and future lines of investigation are pointed out.

Keywords: freshwater fish, insecticide, behavior, activity, pollution.

Índice

1. Introdução	1
2. Material e métodos	6
2.1. Pré-ensaios	6
2.1.1. Escolha do tempo de exposição	7
2.1.3. Procedimento utilizado	8
2.1.4. Seleção das concentrações para o ensaio	9
2.2. Ensaio	10
2.2.1. Captura da espécie-alvo para os ensaios experimentais	10
2.2.2. Sistema de mesocosmos e respetiva preparação	11
2.3. Delineamento experimental	12
2.4. Análise de dados	16
3. Resultados	17
3.1. Pré-ensaios	17
3.2. Ensaio	18
4. Discussão	23
5. Conclusão	27
6. Bibliografia	28

Índice de figuras

Figura 1.1: Exemplar de um indivíduo de uma espécie nativa, o barbo-comum, capturado num troço do rio Lizandro.....	4
Figura 2.2: Inseticida Piretróide Esfenvalerato (Sumifive ® Plus) utilizado para avaliar os efeitos na atividade comportamental do barbo-comum (<i>Luciobarbus bocagei</i>).....	6
Figura 2.3: Exemplares de carpa-comum (<i>Cyprinus carpio</i>) utilizados nos pré-ensaios.	8
Figura 2.4: Captura dos exemplares de barbo-comum, num troço do rio Lizandro, com recurso a um aparelho de pesca elétrica de corrente contínua (Hans-Grassl IG-200).....	10
Figura 2.5: Visão geral do sistema de mesocosmos abrangendo 3 dos 6 canais existentes. A – Entrada de uma fonte de água proveniente de uma nascente de boa qualidade, B – Tanque central de 3000 L que distribui para os canais, C – Tanque a montante do canal, D – Canal do mesocosmos e E – Secção de aclimação, F – Tanque de 70 L a jusante do canal e, G – Bomba.....	12
Figura 2.6: Secção de aclimação a jusante do canal (0,6 m de comprimento e 0,4 m de largura) delimitada por duas redes e coberta por uma rede.	13
Figura 2.7: Pesagem dos exemplares de barbo-comum com recurso a uma balança.	15
Figura 2.8: Medição dos exemplares de barbo-comum com recurso a um ictiómetro.....	16
Figura 3.9: Frequência relativa (%) dos diferentes tipos de atividade de rotina (letargia, natação (procura), natação (fuga) e alterações de direção) executadas pelos exemplares do barbo-comum nos canais experimentais do mesocosmos após exposição prévia (2 horas) a diferentes níveis de concentração do pesticida PE (Cinzento claro – Controlo 0,0 µg/L; Cinzento escuro - Concentração baixa 1,2 µg/L; e Preto - Concentração alta 2,0 µg/L). Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre proporções (testes χ^2) representadas pelas diferentes letras.....	20
Figura 3.10: Coesão de cardume dos exemplares de barbo-comum, avaliada pelo rácio (entre o valor da coesão de cardume e o número de peixes presentes no canal) que varia apenas entre 0,25 e 1. A coesão do cardume foi avaliada de acordo com a seguinte classificação (Manek et al., 2014): 1-nenhum peixe à distância menor que o comprimento de um peixe; 2- dois peixes à distância menor que o comprimento de um peixe; 3- três peixes à distância menor que o comprimento de um peixe e 4- todos os peixes à distância menor que o comprimento de um peixe. A média (ponto central), mediana (risco central) e desvio padrão (bigodes) encontram-se representados no gráfico sendo o cinzento claro – controlo 0,0 µg/L; cinzento escuro - concentração baixa 1,2 µg/L; e preto - concentração alta 2,0 µg/L.....	21
Figura 3.11: Ousadia avaliada através da frequência relativa do número de tentativas e a eficiência de transposição (rácio entre o número de sucessos – sempre que ocorre a transposição da rampa que separa o canal do tanque de montante e, o número de tentativas	

levadas a cabo para transpor a rampa) de barbo-comum observados nos canais do mesocosmos, após prévia exposição a diferentes concentrações (Cinzento claro – Controlo 0,0 µg/L; Cinzento escuro - Concentração baixa 1,2 µg/L; e Preto - Concentração alta 2,0 µg/L do pesticida PE. Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre proporções (testes χ^2) representadas pelas diferentes letras.....22

Índice de tabelas

Tabela 2.1: Parâmetros RAMP “ <i>Reflex Action Mortality Predictors</i> ” (Davis, 2010) avaliados nos exemplares de carpa (<i>Cyprinus carpio</i>).	9
Tabela 3.2: Parâmetros RAMP “ <i>Reflex Action Mortality Predictors</i> ” (Davis, 2010) dos exemplares de carpa após a exposição prévia de 2 horas ao pesticida PE avaliados como: 0- nenhum peixe alterado e 1- pelo menos um peixe alterado, sendo que entre parêntesis se encontra o número total de peixes alterados. (Concentração muito baixa 0,0625 µg/L; Concentração baixa 0,250 µg/L; Concentração média 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L).	17
Tabela 3.3: Parâmetros físico-químicos da água após a exposição prévia de 2 horas ao pesticida PE nos tanques de exposição (Média ± Desvio padrão; Controle 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L).	18
Tabela 3.4: Parâmetros físico-químicos da água em cada canal (Média ± Desvio padrão; Controle 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L; cada um com valores de oxigênio dissolvido de 9,02 mg/L, 9,83 mg/L e 9,75 mg/L, respectivamente e valores de velocidade da água de 0,10 m/s para as três concentrações).	18
Tabela 3.5: Parâmetros biométricos dos exemplares de barbo-comum testados em cada um dos tratamentos, após a exposição prévia a diferentes concentrações do PE (Média ± Desvio padrão; Controle 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L).	19

Lista de abreviaturas

CEN – *European Committee for Standardization*

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DT₅₀ – Tempo de meia-vida do pesticida - período de tempo necessário à dissipação de 50% do pesticida

ICNF - Instituto Português de Conservação da Natureza e das Florestas

ISA - Instituto Superior de Agronomia

K_{aw} - Coeficiência de partição ar-água

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LC – Pouco Preocupante (*Least Concern*)

NND – *The nearest neighbour distance*

OD – Oxigénio dissolvido

PE – Piretróide Esfenvalerato

PEAD - Polietileno de alta densidade

pKa - Constante de ionização ácida

pKb - Constante de ionização básica

UICN - União Internacional para a Conservação da Natureza

1. Introdução

Os ecossistemas fluviais são afetados por uma elevada gama de pressões, das quais a degradação do habitat é a principal causa do declínio de diversas populações aquáticas (Dudgeon et al., 2005). Esta ameaça constitui um elevado risco para a biodiversidade nos ecossistemas aquáticos, podendo conduzir ao declínio ou mesmo há extinção de muitas populações aquáticas no futuro, à medida que novas ameaças vão surgindo, nomeadamente a presença e a libertação de contaminantes (Reid et al., 2018).

Nos dias de hoje, os recursos hídricos encontram-se cada vez mais escassos. Essa escassez deve-se ao consumo crescente de água e também à degradação do estado ecológico dos ecossistemas. A Diretiva – Quadro da água (Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000) refere que é necessário proteger as águas interiores, águas de transição, águas costeiras e águas subterrâneas das pressões a que estão sujeitas, de modo a manter um bom estado/potencial ecológico. As principais causas da degradação e destruição dos ecossistemas aquáticos estão ligadas à construção de barreiras nos cursos de águas, tais como barragens, pequenas centrais hidroelétricas e açudes, extração de inertes do leito fluvial, poluição doméstica e industrial, captação de águas nos períodos de seca, sobrepesca e a introdução de espécies exóticas (Nelson et al., 2016). Algumas destas causas estão relacionadas com as atividades humanas (p.e. destruição, degradação e a fragmentação dos habitats naturais) que são potenciadas pelo uso intensivo da agricultura (Nelson et al., 2016). Estas perturbações antropogénicas comprometem a capacidade de recuperação dos indivíduos de muitas espécies aquáticas, nomeadamente dos peixes (Feio e Ferreira, 2019).

Segundo a Pordata (Base de Dados de Portugal Contemporâneo), a superfície agrícola utilizada em 2013 era cerca de 3 milhões 630 mil hectares, ocupando 40,5% de toda a superfície total de Portugal. Em 2019, esse valor aumentou para 43%, rondando os 4 milhões de hectares. Em consequência desse aumento, tem-se observado uma intensificação da área de produção e um aumento na concentração de diversas substâncias poluentes (Braga e Pinto, 2009). Por exemplo, os pesticidas são os maiores contaminantes no sistema agrícola (Park et al., 2005; Biro et al., 2009) e, por isso, é necessário estudar o comportamento e o destino que têm no ambiente, de modo a conseguir prever e minimizar a contaminação dos solos e águas. O termo pesticida pode ser definido como a substância ou mistura, de origem química ou biológica, que é utilizada para prevenir, destruir ou até controlar organismos indesejáveis como ervas daninhas, insetos, fungos, entre outros, que tenham a capacidade de interferir com a produção, processamento, armazenamento ou venda de alimentos (Chen et al., 2013). O comportamento ambiental dos pesticidas depende de

diversos fatores: as propriedades do próprio pesticida, as condições ambientais e as práticas agrícolas. As propriedades físico-químicas baseiam-se sobretudo na solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição ar-água (K_{aw}), constante de ionização ácida e básica (pK_a e pK_b), período de tempo necessário à dissipação de 50% do pesticida (DT_{50}), entre outros. Por outro lado, dependem também do tipo de solo, topografia, material da zona saturada e da profundidade, recarga dos aquíferos, material do aquífero, condutividade hidráulica e do clima (Freeze e Cherry, 1979; Waldron, 1992; Giuliano, 2019; Yakoub e Azzedine, 2019). Assim que os pesticidas são aplicados na agricultura, adquirem uma dinâmica complexa que poderá resultar na contaminação de vários compartimentos ambientais, como a atmosfera, solo, água, seres vivos e sedimentos, que podem ser contaminados durante o processo de transformação e transporte (Gavrilescu, 2005; Navarro e Navarro, 2007; Villaverde et al., 2008), sobretudo pelo arrastamento do vento, escoamento superficial, drenagem ou lixiviação.

Devido à grande diversidade de produtos, os pesticidas podem ser classificados em três categorias. Consoante o mecanismo de ação, os pesticidas podem ser classificados em i) herbicidas, que controlam as ervas daninhas; ii) os fungicidas que inibem o crescimento dos fungos, entre outros e iii) os inseticidas, que protegem as plantas dos danos causados pelos insetos (Belitz et al., 2004). Podem também ser classificados consoante a estrutura química que apresentam: inorgânicos e orgânicos. Os pesticidas inorgânicos possuem uma origem mineral e são constituídos por arsénio, cobre, mercúrio, chumbo entre outros, não contendo carbono na sua constituição. Hoje em dia, os pesticidas inorgânicos não são muito utilizados, uma vez que alguns foram eliminados do mercado, como é o caso do mercúrio e do arsénio (Waxman, 1998). Os pesticidas orgânicos são de origem sintética e começaram a ser utilizados após a 2ª Guerra Mundial, aquando do surgimento do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Por outro lado, podem também ser divididos do ponto de vista toxicológico. Existem quatro classes onde cada pesticida se insere de acordo com o grau de toxicidade que apresenta. A classe toxicológica I caracteriza-se por apresentar um rótulo de cor vermelho vivo, cuja classificação é “extremamente tóxico”. A classe toxicológica II é representada por um rótulo de cor amarelo intenso e indica que o produto é considerado “altamente tóxico”. A classe toxicológica III é representada pela cor azul intenso, indicando que o pesticida é um produto “medianamente tóxico”. Por fim, a classe IV é representada por um rótulo de cor verde intenso, sendo a sua a classificação “pouco tóxico” (Sanches et al, 2003).

Os inseticidas piretróides surgiram no início dos anos 80. São amplamente utilizados na agricultura (Deanovic et al., 2018) para o controlo e combate de pragas. São extremamente tóxicos e têm a capacidade de persistir nas massas de água durante um longo período de tempo, causando efeitos nocivos nos organismos aquáticos (Siegler et al., 2015; Awoyemi et

al., 2019), ao contrário do que acontece no meio ambiente, em que os piretróides são compostos que não são capazes de persistir no meio ambiente devido ao seu tempo de semi-vida. De acordo com a *U.S. Environmental Protection Agency* (2008) e a *European Food Safety Authority* (2014), o piretróide esfenvalerato (PE) foi classificado como sendo um dos produtos com maior toxicidade para os peixes, e é considerado um composto hidrofóbico, pois apresenta um elevado coeficiente octanol/água ($K_{ow}= 6,2$), extremamente persistente (tempo de meia vida= 66 a 287 anos) e apresenta uma baixa volatilização devido ao elevado ponto de ebulição e à baixa pressão de vapor (Schleier e Peterson, 2011).

Existem vários estudos que analisam o efeito que o inseticida piretróide (nomeadamente o esfenvalerato) tem nos organismos aquáticos (Kumar et al., 2007; Yaji et al., 2011; Shalwei et al., 2012; Cárcamo et al., 2017), mas poucos analisam os seus efeitos sub-letais, após uma exposição prévia no comportamento dos peixes. A presença deste inseticida nas massas de água é suscetível de ser amplificada devido às alterações climáticas (Beyruth, 2008), uma vez que com o aumento da temperatura, a evaporação e diluição das massas de água doce, acaba por ser afetada (Olson, 2019), colocando em perigo diversas espécies, incluindo os peixes (Carr e Chambers, 1996). Os efeitos tóxicos da presença de inseticidas, para além de poderem causar elevada mortalidade (em baixas concentrações), podem também prejudicar as respostas comportamentais dos peixes, uma vez que, ao estarem em contacto com aquele, acabam por reajustar a sua atividade. Segundo Çaliskan (2003), no meio aquático, os piretróides atuam no sistema nervoso central, acabando por serem tóxicos sobretudo para os peixes e de seguida para os anfíbios, mamíferos e pássaros. Para a espécie piscícola *Oryzias latipes* é apenas necessário 1 µg/L de PE para que se verifiquem danos no sistema nervoso central. Por outro lado, baixas concentrações do PE causam efeitos neuro-comportamentais na espécie piscícola *Danio rerio* e, para a espécie *Lepomis macrochirus*, concentrações entre 0,01 e 0,05 µg/L provocaram uma redução nas interações agressivas entre indivíduos desta espécie (Palmquist et al., 2012).

O barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*) (Figura 1.1) é um ciprinídeo nativo da Península Ibérica (Ferreira et al., 1999; Doadrio, 2001; Pinheiro et al., 2004) caracterizado por possuir um corpo alongado, comprimido lateralmente, boca ínfera com lábios grossos com dois pares de barbilhos de comprimento moderado, e com o último raio da barbatana dorsal ossificado e denticulado (Almaça, 1995).



Figura 1.1: Exemplar de um indivíduo de uma espécie nativa, o barbo-comum, capturado num troço do rio Lizandro.

Apresenta o estatuto de conservação de “Pouco Preocupante (LC)” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN), tal como no estatuto de conservação de Portugal (Cabral et al., 2005). Esta espécie dulcaquícola encontra-se adaptada a sistemas mediterrânicos, que são caracterizados por extensos períodos sem pluviosidade, levando a uma fragmentação do contínuo fluvial, natural durante o período estival (Cid et al., 2017). Estes sistemas são ainda afetados por pressões físicas, químicas e ecológicas resultantes de atividades antrópicas, tais como a degradação do habitat e a introdução de uma vasta gama de espécies exóticas e ainda o facto de ser uma espécie sujeita a alguma pressão piscatória (Collares-Pereira et al., 2000; Cabral et al., 2005). Tem uma vasta distribuição nacional, ocupando assim uma gama de habitats lóticos e lênticos, evitando águas de temperaturas muito baixas (Almaça, 1995). Existem sobretudo nas bacias hidrográficas do norte e centro de Portugal (Almaça, 1995), sendo os locais de desova geralmente caracterizados por apresentarem uma menor profundidade e maior velocidade de corrente, com areia ou cascalho e escoamento turbulento o que confere uma maior oxigenação da água (Ferreira et al., 1999). É considerada uma espécie potamódroma, uma vez que efetua migrações sazonais obrigatórias para montante durante a época de reprodução (Lobón-Cerviá e Fernandez-Delgado, 1984). As movimentações têm sido observadas não só em rios, mas também das albufeiras para os seus tributários (Rodríguez-Ruiz e Granado-Lorencio, 1992; Ferreira et al., 1999). Por outro lado, efetuam movimentos para jusante que são efetuados maioritariamente pelos juvenis, geralmente no Outono e Inverno, associados às cheias invernais (Lucas e Batley, 1996) e à procura de troços de rio com maior disponibilidade de alimento. Apresenta um comportamento alimentar bentónico e é omnívoro, recorrendo normalmente ao que exista no local onde se encontra, podendo a sua alimentação variar entre materiais em suspensão, matéria vegetal, insetos e crustáceos (Lobón-Cerviá e Fernandez-Delgado, 1984; Collares-Pereira et al., 2021). A época de reprodução ocorre na Primavera, geralmente entre março e junho (Rodríguez-Ruiz e Granado-

Lorencio, 1992), período em que a espécie assume um comportamento reófilo, ou seja, orienta-se contra fortes correntes de água, efetuando deslocações com fins reprodutivos (Baras e Cherry, 1990; Baras et al., 1994; Lucas e Batley, 1996) sendo que, as fêmeas podem percorrer distâncias superiores aos machos. Estes geralmente apresentam tubérculos nupciais nesta altura crítica.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento de uma espécie ciprinícola nativa – o barbo-comum (*Luciobarbus bocagei* Steindachner, 1864) após a exposição prévia a diferentes concentrações (um controlo, i.e. sem adição de pesticida, uma concentração baixa e uma alta) do pesticida PE num sistema de mesocosmos onde serão estudados os seguintes parâmetros comportamentais: a atividade de rotina, a ousadia (*boldness*) e a coesão de cardume. Estes parâmetros podem ser excelentes indicadores para determinar os efeitos que as prévias exposições ao PE têm nos peixes (Gonino et al., 2019; Leite et al., 2019; Mameri et al., 2020) sendo esperado que respondam significativamente após prévia exposição a concentrações crescentes do PE.

2. Material e métodos

2.1. Pré-ensaios

Primeiramente, foi necessário perceber quais as concentrações de PE (nome comercial: Sumifive ® Plus) (Figura 2.2) a serem utilizadas para avaliar os efeitos que este apresentava nos peixes, uma vez que, após uma consulta bibliográfica detalhada, não foram encontrados estudos semelhantes, desenvolvidos para espécies ciprinícolas ou tão pouco para outras espécies ictíicas ibéricas. O objetivo foi, deste modo, perceber a que concentrações do PE os peixes exibem sinais de alteração do seu comportamento, sem que, contudo, possam provocar a morte do indivíduo (efeitos sub-letais).



Figura 2.2: Inseticida Piretróide Esfenvalerato (Sumifive ® Plus) utilizado para avaliar os efeitos na atividade comportamental do barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*).

No estudo realizado por Barry et al. (1995), a espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) foi previamente exposta ao PE durante 1 hora e, de seguida, verificou-se o seu crescimento e a sobrevivência durante um período de 7 - 28 dias. Para a concentração de 0,025 µg/L, verificaram-se alterações no crescimento dos indivíduos e, quando foram expostos a 0,060 µg/L de PE, acabaram por morrer ao fim de 2 dias. De acordo com Connon et al. (2009), para valores tão pequenos como 0,0625 µg/L de PE, os indivíduos da família *Osmeridea*, demonstraram alterações na natação (menor desempenho). Segundo Palmquist et al. (2012), para os indivíduos da espécie *Oryzias latipes* o sistema nervoso é afetado para concentrações de 1 µg/L de PE. O trabalho de Renick et al. (2015), foi executado com o intuito de se perceber qual a concentração aproximada de PE que pode afetar o comportamento e os efeitos de predação para a família *Atherinopsidae*. As larvas da espécie *Atherinops affinis* foram expostas a diferentes concentrações (0,0; 0,12; 0,59; 1,18 µg/L de PE). Os indivíduos

revelaram sinais de alteração de comportamento na natação quando a concentração de PE aumentou (0,59 e 1,8 µg/L).

Estes estudos demonstraram que as concentrações do inseticida PE a que as diferentes espécies piscícolas reagem são muito variáveis de espécie para espécie. Tendo em conta os diferentes trabalhos analisados na literatura, os valores de concentração de PE que se escolheram para realização de pré-ensaios de definição das concentrações a serem utilizadas posteriormente foram: 0,0625 (concentração muito baixa), 0,250 (concentração baixa), 1,2 (concentração média) e 2,0 µg/L (concentração alta). A primeira concentração (0,0625 µg/L) provém do trabalho de Connon et al. (2009), a segunda concentração (0,250 µg/L) surge do estudo realizado por Renick et al. (2015), a terceira provém do estudo realizado por Palmquist et al. (2012) onde a o sistema nervoso das espécies piscícolas é afetado, alterando o seu comportamento para concentrações de apenas 1 µg/L e, a última concentração (2,0 µg/L) é o dobro da concentração em que se verificam alterações comportamentais nas espécies.

2.1.1. Escolha do tempo de exposição

No estudo de Barry et al. (1995) utilizou-se um tempo de exposição de 1 hora para o mesmo inseticida. Por outro lado, Connon et al. (2009) e Renick et al. (2015), consideraram o mesmo tempo de aclimação de 4 horas para a exposição ao PE. Optou-se por utilizar neste trabalho um tempo de exposição de 2 horas, uma vez que se encontra entre os tempos previamente usados na literatura (1 - 4 horas). Por outro lado, este período de 2 horas, reflete também em média o tempo de exposição aos pesticidas em que, de um modo geral, os peixes estão sujeitos, em rios de pequena e média dimensão, após um evento de precipitação moderada. Foi também necessário utilizar um período de exposição mais curto (2 horas), pois os ensaios foram realizados apenas da parte da manhã (7 - 12 horas) para que os canais nunca tenham exposição solar direta.

2.1.2. Espécie utilizada

Por se tratar de uma espécie nativa dos cursos de água da Península Ibérica com estatuto de conservação, embora “Pouco Preocupante (LC)”, optou-se para o efeito de seleção das concentrações de PE a utilizar nos ensaios posteriores, pela utilização de uma outra espécie da mesma família (*Cyprinidae*), a carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (Figura 2.3). Esta é muito utilizada como indicador biológico da ecotoxicidade em ambientes aquáticos (Ahmad et al., 2015) e facilmente adquirível, seguindo desta forma o atual princípio dos 3R's “*Replacement, Reduction and Refinement*”. Este princípio, que rege as normas básicas da ética e experimentação animal, foca-se no: *Replacement* – substituição do uso de animais

com estatuto de conservação por outros não protegidos; *Reduction* – minimização do número de animais utilizados nos ensaios experimentais ao permitir obter níveis comparáveis de informações a partir de um número menor de indivíduos; *Refinement* – aplicação de procedimentos com vista à minimização da dor e sofrimento, potencialmente experimentados pelos animais (Message e Greenhough, 2019).



Figura 2.3: Exemplos de carpa-comum (*Cyprinus carpio*) utilizados nos pré-ensaios.

2.1.3. Procedimento utilizado

As carpas (n= 14; comprimento médio: 10 cm; variação: 8-11 cm de comprimento total) foram adquiridas numa aquariofilia profissional (Tropizoo ©) e assim que chegaram ao *campus* do Instituto Superior de Agronomia (ISA) foram colocadas num tanque de 1000 L com 800 L de água previamente tratada (Nutrafin Aquaplus ©) com filtro biológico (Filtro Canister FX5 de alto desempenho, Fluval, Quebec, Canadá) com adição de bactérias via Nutrafin Cycle © e arejamento (2 pedras difusoras, diâmetro 7,5 cm) durante um período de 48 horas (2 dias). Os peixes foram alimentados com flocos (Nutrafin ©) até 24 horas antes do início dos pré-ensaios. Tanto a temperatura, o pH e a condutividade no tanque de aclimação foram medidos todos os dias através de uma sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812-5). Após um período de 2 dias, deu-se início aos pré-ensaios. As carpas foram agrupadas em 4 grupos de 3 e foram distribuídas por 4 tanques de 50 L usando pedras (seixos-rolados com diâmetros 4 - 7,5 cm) como substrato e protegidas com rede mosquiteira de modo a minimizar o *stress*, durante o período de aclimação previamente definido (2 horas). Após esse tempo, foram verificados 5 parâmetros em cada peixe, de acordo a metodologia RAMP “*Reflex Action Mortality Predictors*” (Davis, 2010) que foi desenvolvida para avaliar o *stress* e a mortalidade dos peixes (Tabela 2.1), atribuindo a cada exemplar e para cada parâmetro a pontuação de 1 ou 0, consoante se houve ou não alteração do comportamento.

Tabela 2.1: Parâmetros RAMP “*Reflex Action Mortality Predictors*” (Davis, 2010) avaliados nos exemplares de carpa (*Cyprinus carpio*).

Parâmetros	Descrição
Agarrar a região caudal	Agarrar o pedúnculo caudal do peixe dentro de água. O peixe deve tentar libertar-se, se não o fizer então o seu comportamento foi afetado.
Equilíbrio	Virar o peixe ao contrário dentro de água. Se o peixe não se tentar virar, significa que o seu comportamento foi afetado.
Flexão corporal	Segurar o peixe fora de água pelo meio do corpo. O peixe deve tentar escapar-se fazendo flexão do corpo, se não o fizer, então o seu comportamento foi afetado.
Complexo da cabeça	Manter o peixe fora de água e verificar se há movimentação da boca e movimentos operculares. Se o peixe não demonstrar estes movimentos, então o seu comportamento foi afetado.
Resposta ocular	Verificar se há movimento dos olhos consoante o movimento do peixe. O peixe deve efetuar este movimento, se não o fizer, significa que o comportamento foi afetado.

2.1.4. Seleção das concentrações para o ensaio

Após a realização dos pré-ensaios, analisou-se quais foram as concentrações em que houve alteração do comportamento do peixe, adotando essas concentrações para os ensaios posteriores. Verificaram-se os resultados obtidos através dos RAMP (Tabela 2.1) e chegou-se à conclusão de que se iriam excluir as duas concentrações mais baixas (0,0625 e 0,250 µg/L de PE), pois com estas não se obtiveram modificações nos comportamentos dos peixes. Por outro lado, nas concentrações de 1,2 µg/L e 2,0 µg/L de PE, 1 e 2 indivíduos (respetivamente), demonstraram alterações comportamentais para a flexão corporal.

Por isso, manteve-se as seguintes concentrações: controlo (sem adição de PE: 0,0 µg/L), 1,2 µg/L (concentração baixa) e 2 µg/L (concentração alta) do inseticida.

2.2. Ensaios

2.2.1. Captura da espécie-alvo para os ensaios experimentais

A captura da espécie-alvo foi efetuada em maio de 2021 num troço do rio Lizandro (bacia hidrográfica das ribeiras do Oeste) e, no total, foram capturados 36 exemplares juvenis (comprimento total: média \pm desvio padrão: $14 \pm 1,8$ cm). Para o método de captura recorreu-se a um aparelho de pesca elétrica de corrente contínua (Hans Grassl IG-200) (Figura 2.4) (credenciais de pesca elétrica n.º 299/2021/CAPT e n.º 300/2021/CAPT atribuídas pelo Instituto Português de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF)), seguindo os protocolos da *European Committee for Standardization* (CEN, 2003). É um processo eficiente para águas vadiáveis (profundidade média < 80 cm) e relativamente inofensivo para a fauna piscícola. Este baseia-se na captura por eletricidade, criando um campo elétrico na massa de água produzindo alterações no comportamento dos peixes, mas não alterando as suas características físicas (Barbour et al., 1999).



Figura 2.4: Captura dos exemplares de barbo-comum, num troço do rio Lizandro, com recurso a um aparelho de pesca elétrica de corrente contínua (Hans-Grassl IG-200).

Primeiramente, a equipa de 2 elementos selecionou um troço de 100 m de comprimento do rio Lizandro e de seguida, procedeu-se à amostragem tendo em conta o “Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola” (Bernardo et al., 2008). A equipa percorreu a pé o curso de água para montante, em forma de *zig-zag* entre as 2 margens, amostrando os diferentes habitats existentes. Após a captura, os indivíduos foram mantidos dentro de água, numa nassa, até recuperarem o seu estado original, de modo a terem uma oxigenação natural. De seguida, todos os peixes capturados foram medidos com recurso a um ictiómetro, tendo sido posteriormente transportados para o *campus* do ISA em contentores de transporte de peixes (Hans Grassl, 190 L), e com um aparelho de arejamento portátil (ELITE, Alemanha) para minimizar o *stress* durante o transporte.

2.2.2. Sistema de mesocosmos e respetiva preparação

O sistema de mesocosmos tem como objetivo simular as condições ambientais de um ecossistema aquático com um elevado grau de realismo (Odum, 1984; Van den Brink et al., 2005), sendo considerado um modelo simplificado do mundo real. Os testes realizados neste tipo de sistema permitem avaliar a toxicidade dos pesticidas e estimar o efeito dos produtos químicos nos ecossistemas (Giesy, 1980; Crossland e LaPoint, 1992). O modelo de mesocosmos pode ser classificado como fechado, onde as variáveis físicas e químicas são controladas; ou aberto, onde não há controlo das variáveis ambientais (Rowe e Dunson, 1994, Caquet et al., 2000).

Todos os ensaios e os trabalhos associados foram realizados no mesocosmos do ISA, junto à linha de água existente. Este consiste num conjunto de 6 canais artificiais externos de zinco (cada um com 4 m de comprimento x 0,4 m de largura x 0,2 m de profundidade), para onde a água, proveniente de uma nascente de boa qualidade (temperatura: 19,1°C; pH= 8,06; condutividade= 865 $\mu\text{S}/\text{cm}$; oxigénio dissolvido (OD)= 9 mg/L), é fornecida após ser armazenada num tanque central de 3000 L. A água é distribuída para os recipientes principais localizados na seção superior de cada canal. Daí, a água verte, através de uma rampa (36 cm de altura x 47 cm de comprimento e um declive de 50%) para cada canal, delimitado a jusante por um painel de malha fixa. Posteriormente, segue para um tanque a jusante (70 L), conectado a uma bomba (Kripsol OK-71 B, 0,56 kW), operando num sistema fechado de recirculação para o recipiente principal. Este sistema de recirculação torna cada canal independente. A distribuição e a recirculação da água foram asseguradas com um sistema de tubos de polietileno de alta densidade (PEAD). É de referir que para este ensaio foram apenas utilizados 3 dos 6 canais existentes no mesocosmos, correspondendo cada um a uma das três concentrações a que os peixes foram previamente expostos (controlo 0,0 $\mu\text{g}/\text{L}$, concentração baixa 1,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ e concentração alta 2,0 $\mu\text{g}/\text{L}$). O sistema de mesocosmos do ISA encontra-se ilustrado na Figura 2.5.

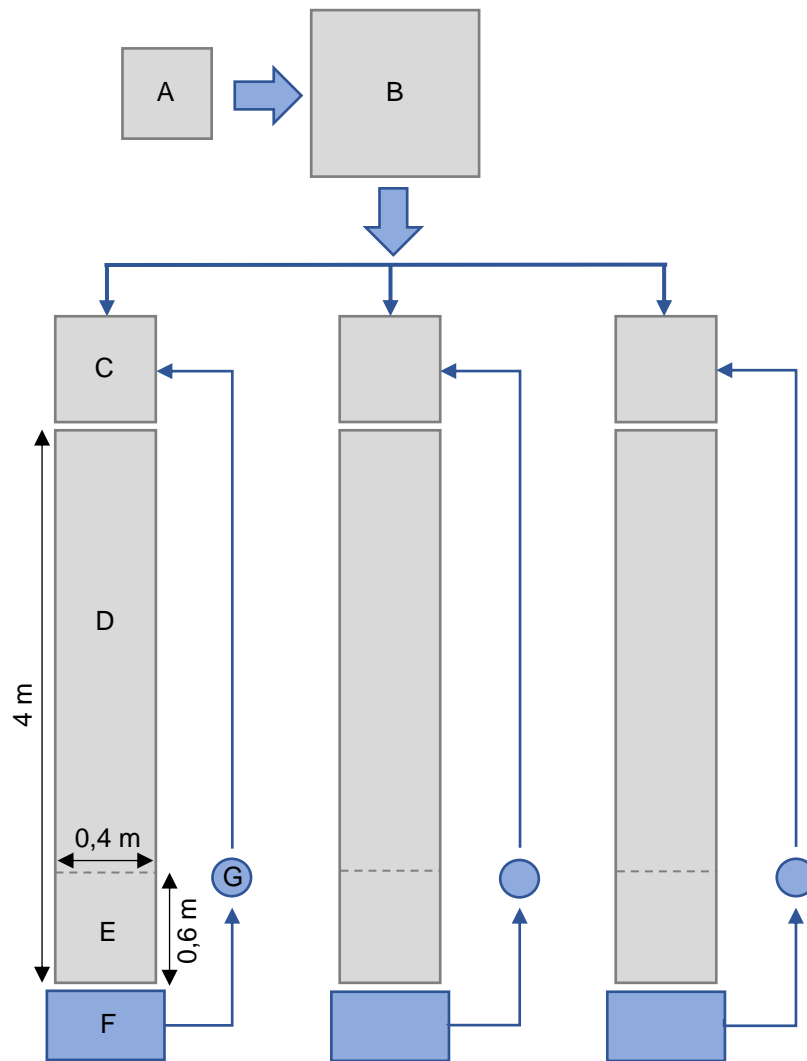


Figura 2.5: Visão geral do sistema de mesocosmos abrangendo 3 dos 6 canais existentes. A – Entrada de uma fonte de água proveniente de uma nascente de boa qualidade, B – Tanque central de 3000 L que distribui para os canais, C – Tanque a montante do canal, D – Canal do mesocosmos e E – Seção de aclimação, F – Tanque de 70 L a jusante do canal e, G – Bomba.

2.3. Delineamento experimental

No *campus*, os peixes foram mantidos por um período de 2 dias num tanque de 1000 L com 800 L de água previamente tratada (Nutrafin Aquaplus ©) com filtro biológico (Filtro Canister FX5 de alto desempenho, Fluval, Quebec, Canadá com adição de bactérias via Nutrafin Cycle ©) e arejamento (2 pedras difusoras, diâmetro 7,5 cm) durante um período de 48 horas (2 dias). Os peixes foram alimentados com flocos (Nutrafin ©) até 24 horas antes do início dos pré-ensaios. Tanto a temperatura, como o pH e a condutividade no tanque de aclimação foram medidos todos os dias através de uma sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812-5).

Após a aclimação no tanque com 800 L de água, os peixes (3 conjuntos de 4 peixes) foram colocados de seguida em três pequenos tanques (um por cada concentração) com 50 L de água, pedras (seixos-rolados com diâmetros 4-7,5 cm) para fornecer abrigo, tendo sido cobertos com rede mosquiteira de modo a aumentar a cobertura e minimizar o *stress*, evitando simultaneamente que algum exemplar saltasse para fora. Após a exposição de 2 horas ao PE, retiraram-se os peixes, que foram diretamente transferidos para o mesocosmos. A qualidade da água (temperatura, pH e condutividade) foi verificada todos os dias através de uma sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812-5), tanto no tanque que continha 800 L de água, como nos mais pequenos (50L) e no mesocosmos, antes e após os ensaios. O oxigénio dissolvido foi apenas verificado nos canais de mesocosmos através de um medidor de oxigénio dissolvido (HI98193).

No mesocosmos, os peixes foram colocados em três canais que continham água da nascente do ISA a correr em regime fechado (profundidade média= 0,12 m; velocidade média= 0,1 m/s), com o objetivo de determinar a atividade comportamental dos indivíduos após prévia exposição durante 2 horas a diferentes concentrações do PE. Primeiramente, foi feito um período de aclimação às condições do mesocosmos durante 10 minutos, em que os peixes se encontravam confinados numa secção (0,6 m de comprimento e 0,4 m de largura) na parte jusante do canal, delimitado por uma rede (Leite et al., 2019) (Figura 2.6). Após esse período, a rede foi removida para que os peixes pudessem ter acesso a todo o canal, permitindo que se movessem naturalmente sem pressões externas.



Figura 2.6: Secção de aclimação a jusante do canal (0,6 m de comprimento e 0,4 m de largura) delimitada por duas redes e coberta por uma rede.

Cada um dos três tratamentos experimentais (controle, 1,2 e 2 µg/L) foi replicado três vezes, dando um total de nove réplicas. Cada réplica teve a duração de 60 minutos e consistiu em amostragens instantâneas a cada 3 minutos, ou seja, a cada 3 minutos foi necessário verificar o comportamento dos indivíduos do barbo-comum para perceber qual o efeito que PE teve nos exemplares após prévia exposição. Avaliaram-se então os seguintes parâmetros:

- A atividade de rotina – de acordo com Werner e Anholt (1993) e Laubenstein et al., (2018) a atividade de rotina é importante do ponto de vista ecológico, pois o seu aumento está relacionado diretamente com aumento das taxas de alimentação e de crescimento. Foi avaliada de acordo com os seguintes comportamentos evidenciados pelos peixes: i) letargia; ii) natação (procura); iii) natação (fuga) e iv) alterações de direção de 90° no rumo do peixe (Brownscombe et al., 2014).
- Coesão de cardume – é uma estratégia comportamental avaliada em peixes (Smith et al., 2018). É um parâmetro bastante relevante, pois está relacionado com a sobrevivência dos peixes que vivem em grupo, melhorando a resposta às ameaças, reduzindo o *stress* a que estão expostos e o risco individual (Foster e Treherne, 1981). Foi classificada de acordo com a seguinte pontuação (Manek et al., 2004): 1- nenhum peixe à distância menor que o comprimento de um peixe; 2- dois peixes à distância menor que o comprimento de um peixe; 3- três peixes à distância menor que o comprimento de um peixe e 4- todos os peixes à distância menor que o comprimento de um peixe. Neste parâmetro foi necessário fazer um rácio entre o valor da coesão de cardume e o número de peixes presentes no canal, isto porque devido à possibilidade de passagem dos exemplares para o tanque de montante através da transposição rampa, nem sempre existiram simultaneamente o mesmo número de exemplares no canal. O referido rácio varia entre 0,25 (quando a coesão de cardume é 1 e se encontram 4 peixes no canal) e 1 (quando todos os indivíduos presentes no canal se encontram juntos).
- Ousadia (*boldness*) – é uma das características mais avaliada em peixes (Wilson et al., 1994; Ariyomo e Watt, 2012). O aumento desta está relacionada com a procura dos exemplares por áreas mais favoráveis para a desova, alimentação e até mesmo para encontrar refúgio (Biro et al., 2003). Foi avaliada tendo em conta o número de tentativas que os indivíduos de barbo-comum realizaram ao tentarem explorar a secção a montante do canal, transpondo a rampa. Essa transposição representa ousadia, ou seja, a vontade de assumir riscos (Laubenstein et al., 2018). Adicionalmente foi ainda calculada, a eficiência de transposição (%), definida como o rácio entre o número de sucessos - sempre que ocorre a transposição da rampa que

separa o canal do tanque de montante - e, o número de tentativas levadas a cabo para transpor a rampa.

Antes e depois de cada ensaio, verificaram-se os parâmetros de qualidade da água (pH, temperatura, condutividade) através de uma sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812), a altura da água (com uma régua) e a velocidade do escoamento com recurso a um velocímetro (*Global Water Instrumentation, Inc., USA, mod. FP-101*). No final de cada ensaio, os exemplares de barbo-comum foram pesados com uma balança (escala em g) (Figura 2.7) e medidos com recurso a um ictiómetro (Figura 2.8). Após a realização dos ensaios, os peixes foram devolvidos ao seu meio natural.



Figura 2.7: Pesagem dos exemplares de barbo-comum com recurso a uma balança.



Figura 2.8: Medição dos exemplares de barbo-comum com recurso a um ictiómetro.

2.4. Análise de dados

Foram realizados testes para testar a existência ou não de diferenças significativas nos diferentes níveis de cada parâmetro (atividade de rotina, coesão de cardume e ousadia), onde os exemplares de barbo-comum foram previamente expostos a 2 horas às diferentes concentrações do PE (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; e concentração alta 2,0 µg/L). O teste de proporção de qui-quadrado (χ^2), utilizando o package estatístico *MedCalc Software*, foi utilizado para a atividade de rotina e ousadia. Para a coesão de cardume foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

3. Resultados

3.1. Pré-ensaios

Através da Tabela 3.2 é possível observar que, para os exemplares de carpa utilizados nos pré-ensaios para as quatro concentrações, de uma forma geral não foram encontradas alterações ao nível dos parâmetros RAMP, à exceção da flexão corporal que evidenciou sinais de alteração em 3 exemplares, um previamente exposto à concentração média (1,2 µg/L), e dois à alta (2,0 µg/L).

Tabela 3.2: Parâmetros RAMP “*Reflex Action Mortality Predictors*” (Davis, 2010) dos exemplares de carpa após a exposição prévia de 2 horas ao pesticida PE avaliados como: 0- nenhum peixe alterado e 1- pelo menos um peixe alterado, sendo que entre parêntesis se encontra o número total de peixes alterados. (Concentração muito baixa 0,0625 µg/L; Concentração baixa 0,250 µg/L; Concentração média 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L).

Parâmetros	Concentração muito baixa (0,0625 µg/L)	Concentração baixa (0,250 µg/L)	Concentração média (1,2 µg/L)	Concentração alta (2,0 µg/L)
Agarrar a região caudal	0	0	0	0
Equilíbrio	0	0	0	0
Flexão corporal	0	0	1(1)	1(2)
Complexo da cabeça	0	0	0	0
Resposta ocular	0	0	0	0

Com base nos resultados obtidos na Tabela 3.2, foram selecionadas para os ensaios experimentais apenas as concentrações onde o PE alterou o comportamento dos indivíduos e o controlo: controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L e concentração alta 2,0 µg/L, demonstradas na Tabela 3.3.

3.2. Ensaio

Após a exposição prévia de 2 horas dos exemplares de barbo-comum às três concentrações do PE, os valores dos principais parâmetros físico-químicos da água, revelaram-se bastante semelhantes (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Parâmetros físico-químicos da água após a exposição prévia de 2 horas ao pesticida PE nos tanques de exposição (Média \pm Desvio padrão; Controlo 0,0 $\mu\text{g/L}$; Concentração baixa 1,2 $\mu\text{g/L}$; e Concentração alta 2,0 $\mu\text{g/L}$).

Parâmetros	Controlo	Concentração baixa	Concentração alta
	(0,0 $\mu\text{g/L}$)	(1,2 $\mu\text{g/L}$)	(2,0 $\mu\text{g/L}$)
pH	7,92 \pm 0,09	7,79 \pm 0,27	7,96 \pm 0,04
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	17,37 \pm 0,17	17,37 \pm 0,17	17,57 \pm 0,17
Condutividade (mS/cm)	0,86 \pm 0,08	0,86 \pm 0,07	0,80 \pm 0,01

Os resultados apresentados na Tabela 3.4, evidenciam os parâmetros físico-químicos da água em cada um dos três canais do mesocosmos, correspondendo a cada uma das três concentrações (controlo, concentração baixa e concentração alta), medidos imediatamente antes da realização dos ensaios experimentais com os exemplares de barbo-comum. Tanto a velocidade da água como o oxigénio dissolvido foram medidos apenas uma vez em cada canal e por isso não apresentam desvio-padrão.

Tabela 3.4: Parâmetros físico-químicos da água em cada canal (Média \pm Desvio padrão; Controlo 0,0 $\mu\text{g/L}$; Concentração baixa 1,2 $\mu\text{g/L}$; e Concentração alta 2,0 $\mu\text{g/L}$; cada um com valores de oxigénio dissolvido de 9,02 mg/L, 9,83 mg/L e 9,75 mg/L, respetivamente e valores de velocidade da água de 0,10 m/s para as três concentrações).

Parâmetros	Controlo	Concentração baixa	Concentração alta
	(0,0 $\mu\text{g/L}$)	(1,2 $\mu\text{g/L}$)	(2,0 $\mu\text{g/L}$)
pH	8,42 \pm 0,19	8,45 \pm 0,24	8,44 \pm 0,27
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	19,08 \pm 1,13	19,06 \pm 1,10	19,06 \pm 1,11
Condutividade (mS/cm)	0,83 \pm 0,02	0,83 \pm 0,02	0,81 \pm 0,01
Profundidade (cm)	12,30 \pm 0,35	12,92 \pm 1,01	12,17 \pm 0,92

Na Tabela 3.5 é possível verificar que os peixes utilizados em cada tratamento com diferentes concentrações de PE, evidenciaram comprimentos totais e massa semelhantes.

Tabela 3.5: Parâmetros biométricos dos exemplares de barbo-comum testados em cada um dos tratamentos, após a exposição prévia a diferentes concentrações do PE (Média ± Desvio padrão; Controlo 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L).

Parâmetros	Controlo		Concentração baixa		Concentração alta	
	(0,0 µg/L)		(1,2 µg/L)		(2,0 µg/L)	
Comprimento total (cm)	14,5	± 1,7	13,9	± 2,1	14,6	± 1,5
Massa (g)	28,82	± 11,5	28,33	± 9,36	30,75	± 9,22

Os resultados referentes à atividade de rotina (Figura 3.9) mostram que, em termos de frequência relativa (%), a letargia é o comportamento que apresentou diferenças significativas entre o controlo e a concentração alta ($\chi^2 = 4,542$ e $p = 0,033$), não tendo sido observadas diferenças no emparelhamento entre as restantes concentrações no que diz respeito a esta variável (Controlo vs. Concentração baixa: $\chi^2 = 2,643$ e $p = 0,104$; Concentração baixa vs. Concentração alta: $\chi^2 = 0,168$ e $p = 0,682$). Em particular, com a adição do pesticida, do controlo para a concentração alta houve um aumento significativo na percentagem de tempo passado em letargia (de 25,23% para 44,87%). A atividade de natação (procura) revelou ser a mais frequentemente desempenhada pelos exemplares de barbo-comum, que passaram a maior parte do tempo (> 50%), independentemente da exposição prévia a diferentes concentrações de PE, nesta atividade. Não foram, contudo, encontradas diferenças significativas nesta variável para as 3 concentrações de PE testadas (Controlo vs. Concentração baixa: $\chi^2 = 2,173$ e $p = 0,140$; Controlo vs. Concentração alta: $\chi^2 = 1,620$ e $p = 0,203$; Concentração baixa vs. Concentração alta: $\chi^2 = 0,008$ e $p = 0,927$). Tanto para a natação (fuga) como para as alterações de direção, não foi efetuado nenhum teste estatístico devido ao número de amostras ser pequeno ($N = 4$ e $N = 39$, respetivamente).

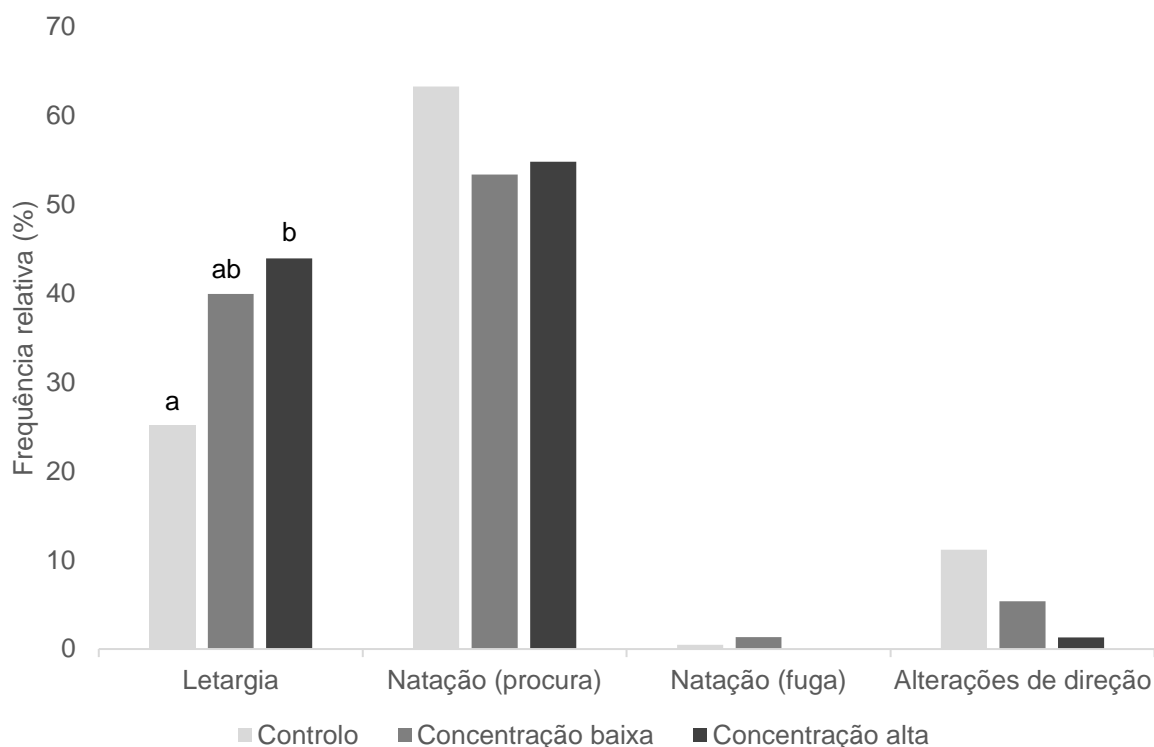


Figura 3.9: Frequência relativa (%) dos diferentes tipos de atividade de rotina (letargia, natação (procura), natação (fuga) e alterações de direção) executadas pelos exemplares do barbo-comum nos canais experimentais do mesocosmos após exposição prévia (2 horas) a diferentes níveis de concentração do pesticida PE (Cinzento claro – Controlo 0,0 µg/L; Cinzento escuro - Concentração baixa 1,2 µg/L; e Preto - Concentração alta 2,0 µg/L). Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre proporções (testes χ^2) representadas pelas diferentes letras.

Os resultados referentes à coesão de cardume dos exemplares de barbo-comum avaliada durante os ensaios experimentais encontram-se na Figura 3.10. Através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível concluir que, não existem diferenças significativas entre as três concentrações (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L) ($\chi^2 = 0,626$ e $p = 0,731$).

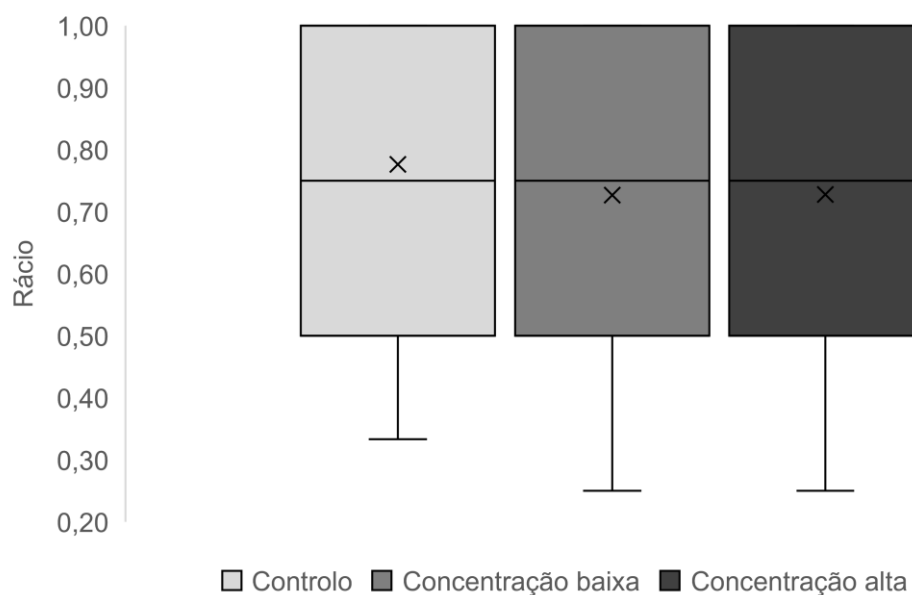


Figura 3.10: Coesão de cardume dos exemplares de barbo-comum, avaliada pelo rácio (entre o valor da coesão de cardume e o número de peixes presentes no canal) que varia apenas entre 0,25 e 1. A coesão do cardume foi avaliada de acordo com a seguinte classificação (Manek et al., 2014): 1-nenhum peixe à distância menor que o comprimento de um peixe; 2- dois peixes à distância menor que o comprimento de um peixe; 3- três peixes à distância menor que o comprimento de um peixe e 4- todos os peixes à distância menor que o comprimento de um peixe. A média (ponto central), mediana (risco central) e desvio padrão (bigodes) encontram-se representados no gráfico sendo o cinzento claro – controlo 0,0 µg/L; cinzento escuro - concentração baixa 1,2 µg/L; e preto - concentração alta 2,0 µg/L.

No que diz respeito à ousadia, na Figura 3.11, é possível observar a frequência relativa (%) do número de tentativas e a eficiência de transposição (%) (rácio entre o número de sucessos - sempre que ocorre a transposição da rampa que separa o canal do tanque de montante e, o número de tentativas levadas a cabo para transpor a rampa) dos exemplares de barbo-comum durante os ensaios experimentais, após prévia exposição a diferentes concentrações do PE (0,0; 1,2; 2,0 µg/L). Relativamente à frequência relativa do número de tentativas, foi observado um decréscimo significativo da proporção de tentativas do controlo (37,43%) para a concentração baixa (21,05%) ($\chi^2 = 4,993$ e $p = 0,025$) e um posterior acréscimo significativo desta para a concentração alta (41,52%) ($\chi^2 = 7,962$ e $p = 0,005$). Por outro lado, não se observaram diferenças significativas entre o controlo e a concentração alta ($\chi^2 = 0,315$ e $p = 0,574$). Como tal, foi na concentração baixa em que a proporção de tentativas foi significativamente menor. Relativamente à eficiência de transposição, embora visualmente se tenha observado um decréscimo deste parâmetro com o aumento da concentração de PE, nomeadamente do controlo (21,09%) para a concentração baixa (6,94%), não se observaram

diferenças estatisticamente significativas neste último parâmetro (Controlo vs. Concentração baixa: $\chi^2 = 0,003$ e $p = 0,953$; Controlo vs. Concentração alta: $\chi^2 = 0,141$ e $p = 0,708$).

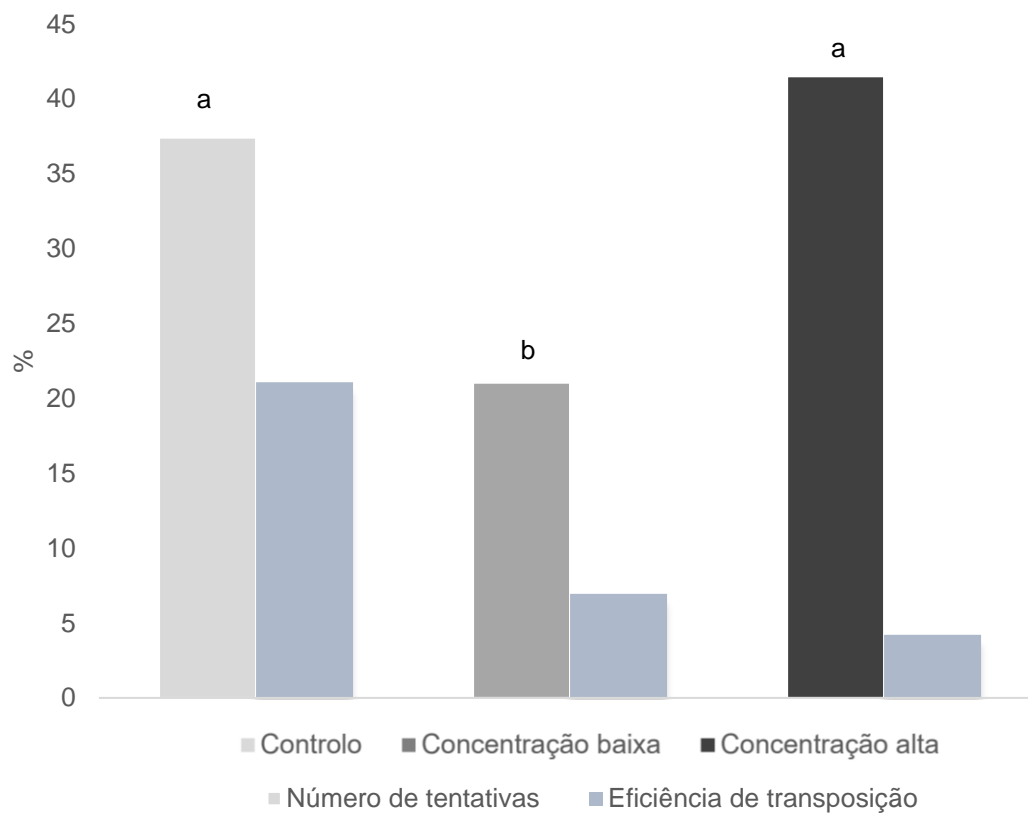


Figura 3.11: Ousadia avaliada através da frequência relativa do número de tentativas e a eficiência de transposição (rácio entre o número de sucessos – sempre que ocorre a transposição da rampa que separa o canal do tanque de montante e, o número de tentativas levadas a cabo para transpor a rampa) de barbo-comum observados nos canais do mesocosmos, após prévia exposição a diferentes concentrações (Cinza claro – Controlo 0,0 $\mu\text{g/L}$; Cinza escuro - Concentração baixa 1,2 $\mu\text{g/L}$; e Preto - Concentração alta 2,0 $\mu\text{g/L}$ do pesticida PE. Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre proporções (testes χ^2) representadas pelas diferentes letras.

4. Discussão

Nos últimos anos, a contaminação dos ecossistemas aquáticos, em particular dos rios, tem vindo a aumentar devido à intensificação de escoamentos agrícolas, industriais e urbanos (Verhougstraete et al., 2015; Beiras, 2018). O uso excessivo de pesticidas é uma das principais causas, sendo os inseticidas um dos pesticidas mais frequentemente encontrados nestes sistemas (Liu et al., 2009). Os inseticidas do tipo piretróides são extensamente utilizados devido ao potencial reduzido impacto para os diferentes utilizadores, por se utilizarem em baixas concentrações e devido à sua seletividade (López-López et al., 2001). É importante serem estudados para perceber quais são os efeitos que tem nos peixes pois estes são conhecidos por serem mil vezes mais tóxicos em peixes do que mamíferos/aves, devido à absorção do pesticida através das brânquias (Edwards et al., 1986; Srivastav et al., 1997). O PE é um dos inseticidas com maior potencial de acumulação em peixes, acabando por ser prejudicial para os organismos aquáticos (Suvetha et al., 2015; Wang et al., 2016). Segundo estudos realizados por Yaji et al., (2011), Shalwei et al., (2012) e Cárcamo et al., (2017), existe uma correlação positiva entre as altas concentrações do pesticida e a mortalidade dos peixes. É também possível que ocorra a perda de equilíbrio, ritmo de natação acelerado e convulsões (Kumar et al., 2007). Este trabalho teve como objetivo, avaliar o comportamento do barbo-comum, uma espécie ciprinícola nativa presente em quase todas as bacias hidrográficas de Portugal continental (Pinheiro et al., 2004) após prévia exposição de 2 horas a diferentes concentrações (0,0; 1,2; 2,0 µg/L) do pesticida PE num sistema de mesocosmos, utilizando como parâmetros, a atividade de rotina, a coesão de cardume e a ousadia.

No que diz respeito à atividade de rotina, os resultados mostram que com o aumento da concentração de PE, os exemplares do barbo-comum dispensaram mais tempo em natação (procura) do que para as restantes três atividades: letargia, natação (fuga) e alterações de direção. Sendo que, apenas a letargia demonstrou diferenças significativas entre o controlo e a concentração alta do PE. Esta diferença significativa pode ter implicação numa menor probabilidade de encontrarem alimento devido a uma menor atividade e, como tal, traduzir-se em taxas de crescimento mais baixas a médio prazo (Laubenstein et al., 2018; Werner e Anholt, 1993). O resultado do parâmetro da letargia que se obteve é concordante com o trabalho de Gonino et al., (2019), em que peixes da mesma espécie e do mesmo estágio de vida (juvenil) também responderam à exposição crescente de concentração de cinzas de fogos florestais com um aumento do tempo em letargia. Este fenómeno é ainda suportado por outros estudos (Marigoudar et al., 2009; Huang et al., 2016; Qiu et al., 2017), que mostram que a exposição dos peixes a diferentes pesticidas (Cipermetrina: 0,57 e 0,33 mg/L; Deltametrina: 7,5 e 15 µg/L; Clorpirifós: 0,024 mg/L, respetivamente) também pode alterar a velocidade de natação, acabando até por adotarem uma posição de repouso. Para

concentrações de deltametrina superiores a 7 µg/L, os exemplares de *Danio rerio* apresentaram uma movimentação rápida das brânquias, rápidos movimentos operculares e natação irregular (Huang et al., 2016). Para Floyd et al., (2008), exemplares de *Pimephales promelas* expostos (4 horas) a concentrações (0,072, 0,455 e 1,142 µg/L) sub-letais do inseticida PE apresentaram anomalias na natação e um maior risco de predação. Também é possível concluir que, segundo estudos realizados por Black (1998) e Buhl e Hamilton (1991), os peixes se encontram mais sensíveis e mais propensos à contaminação por pesticidas nos primeiros estágios de vida. Tal advém do facto de peixes em estágios de vida iniciais não terem ainda as vias metabólicas totalmente desenvolvidas para conseguirem degradar compostos químicos estranhos a um organismo (xenobióticos) como têm os peixes adultos. O resultado do parâmetro obtido é ainda concordante com os trabalhos de Anderson e Weber (1975), Peters e Livingstone (1995) e Whyte et al. (2000).

A coesão de cardume é uma variável comportamental muito estudada nos peixes (Smith et al., 2018) e, do ponto de vista ecológico, é fundamental pois pode potenciar a sobrevivência dos peixes que se movimentam em cardume, conferindo i) um menor risco individual de os peixes serem capturados por um predador à medida que a coesão aumenta ii) uma maior probabilidade de um predador ser detetado mais rapidamente (Ward et al., 2008) e iii) uma maior capacidade de resposta do cardume por meio de manobras de evasão sincronizadas (Hall et al., 1986). No presente trabalho, os resultados relativamente à coesão de cardume demonstraram que não foram encontradas diferenças para as três concentrações utilizadas. De acordo com Gonino et al. (2019) a coesão do cardume diminuiu à medida que aumentou a concentração a que os exemplares de barbo-comum foram expostos a uma maior concentração de cinzas. O facto de se ter observado uma redução da atividade pode parcialmente explicar este fenómeno, uma vez que segundo Pritchard et al. (2001) um aumento na atividade dos peixes pode aumentar a coesão do cardume. Estudos realizados por Bartolini et al. (2015) e Colchen et al. (2017), avaliaram também a coesão de cardume, tendo em conta uma classificação diferente, a NND – “*the nearest neighbour distance*”, que consiste na distância mais próxima de um peixe a outro da mesma espécie (Tien et al., 2004) e concluíram que a coesão do cardume tende a alterar-se, diminuindo quando existe um aumento na temperatura, ou até mesmo quando ocorrem combinações de diferentes *perturbações* (Maulvault et al., 2018). A ausência de diferenças significativas no que diz respeito à coesão do cardume em resposta à crescente concentração do pesticida do PE a que previamente foram expostos os exemplares, pode também ser parcialmente explicada pelo baixo tempo de exposição (2 horas), quando comparada com o estudo realizado por Gonino et al. (2019), em que o tempo de exposição às cinzas foi de 24 horas, sendo necessário a realização de estudos futuros para clarificar este ponto.

A ousadia foi avaliada de acordo com o número de tentativas que os indivíduos de barbo-comum realizaram ao tentarem explorar a secção a montante do canal, transpondo a rampa. O aumento da ousadia tem sido muito associado ao aumento de taxas de alimentação e crescimento e à procura por áreas mais favoráveis para refúgio e desova (Biro et al., 2003; Laubenstein et al., 2018). É de notar que o número de tentativas aumentou do controlo (37,43%) para a concentração alta (41,52%), enquanto na concentração baixa obteve-se a menor frequência relativa (%) de tentativas (21,05%). Ou seja, o número de tentativas, primeiramente diminuiu significativamente do controlo para a concentração baixa possivelmente por ter existido uma retração da ousadia à presença do PE, sendo que depois aumentou significativamente para a concentração alta (onde o ambiente já se encontrava bastante alterado). Este aumento da ousadia para a concentração alta, onde existe um decréscimo na concentração baixa, está relacionado com o efeito do tipo “*subsidy-stress gradient*”, neste contexto, demonstra que mesmo em concentrações baixas e altas de um *stress* externo, os indivíduos podem responder favoravelmente ou negativamente, respetivamente, ao mesmo tipo de pressão (Odum et al., 1979). Os indivíduos respondem a um baixo nível de *stress* tornando-se menos afoitos, enquanto que, a um nível superior desse *stress* acabam por tentar “fugir” do local afetado, aumentando assim o número de tentativas de fuga (transposição da rampa a montante). Segundo Leite et al. (2019) e Coleman e Wilson (1998) indivíduos mais tímidos tendem a recuar quando expostos a um “perigo”, enquanto indivíduos mais ousados tendem a explorar o ambiente, apresentando uma maior tendência para assumir riscos. O número de tentativas foi superior para a concentração alta, ao contrário do que aconteceu com a eficiência de transposição, que diminuiu com a presença do inseticida, talvez porque o PE tenha afetado a capacidade de natação ou de saltos dos exemplares de barbo-comum, reduzindo a capacidade de transposição da rampa a montante. Relativamente à eficiência de transposição (%), não se observaram diferenças estatisticamente significativas para as três concentrações, embora visivelmente se tenha observado um decréscimo deste indicador com o aumento da concentração de PE, nomeadamente do controlo para a concentração baixa. A ausência de diferenças significativas, poderá ter sido devida ao baixo número de sucessos observados, sobretudo nos ensaios com a presença do PE (n= 5, concentração baixa, n= 6, concentração alta).

A poluição dos ecossistemas aquáticos é um problema que se tem vindo a revelar crescente devido ao aumento da quantidade de produtos industriais, agrícolas e químicos que são sistematicamente despejados nos rios e ribeiras (McGlashan e Hunghe, 2001; Ali et al., 2008), provocando uma deterioração do estado ecológico, com efeitos nas comunidades piscícolas (Mahmoud, 2015). É necessário implementar medidas de gestão e conservação de modo a não prejudicar a saúde dos ecossistemas aquáticos. Uma das medidas de conservação pode ser a manutenção e a plantação de vegetação ripária nativa, as quais

constituem zonas tampão, pois têm o potencial para reter contaminantes agroquímicos e assegurar a saúde dos ecossistemas aquáticos (Feld et al., 2018). Funcionam também como interface entre a zona terrestre-aquática e são locais de armazenamento de água, recarga de aquíferos e até de conversão de nutrientes e matéria orgânica (Hughes, 1997; Dwire e Lowrence, 2006). As fontes de poluição também causam muitos problemas nos seres vivos que habitam nos sistemas aquáticos, uma vez que descarregam para a água p.e. sais minerais, substâncias não biodegradáveis, fertilizantes, pesticidas, compostos farmacêuticos, detergentes e metais pesados (Wu et al., 2020), sendo como tal necessário um controlo e monitorização continuo destas fontes de poluição, tanto pontuais como difusas. É importante salientar que neste trabalho, para se efetuar a avaliação das alterações comportamentais nos exemplares de barbo-comum, foi analisado um de muitos inseticidas utilizados com regularidade na agricultura (Deanovic et al., 2018), podendo estes contaminantes em meio natural, interagir de forma sinérgica com outros (p.e. fungicidas, herbicidas), aumentando o efeito da prévia exposição ao PE (Piggott et al., 2015). Desta forma, seria desejável que no futuro, se estudasse o efeito que um conjunto de pesticidas provoca nos exemplares de uma espécie e se verificasse também quais as alterações nos respetivos parâmetros em estudo (atividade de rotina, coesão de cardume e ousadia).

5. Conclusão

Os resultados deste estudo evidenciaram que o comportamento do barbo-comum foi afetado pela prévia exposição ao pesticida PE, tendo demonstrado uma alteração significativa nos parâmetros atividade de rotina e ousadia e que mesmo uma exposição de curta duração (2 horas) foi suficiente para alterar o comportamento de uma espécie piscícola nativa, com implicações ecológicas a diferentes níveis. Para a atividade de rotina, concluiu-se que a maior proporção de tempo foi passada em natação (procura) pelos exemplares de barbo-comum, mas apenas a letargia demonstrou diferenças significativas. A ousadia foi superior tanto na ausência como na concentração alta do PE, enquanto a menor ousadia foi na presença da concentração baixa do PE. A diferença significativa no parâmetro da letargia entre o controlo e a concentração alta do PE pode ter implicações ao nível do crescimento do indivíduo, pois passam maior tempo em letargia e a sua procura por alimento poderá ser menor (Laubenstein et al., 2018; Werner e Anholt, 1993). Na ousadia, verifica-se que em baixos níveis e altos de PE, os indivíduos respondem a esse *stress* favoravelmente ou negativamente (Odum et al., 1979), acabando por serem mais tímidos a baixos níveis e mais afoitos quando estão presentes a um nível elevado, acabando por tentar “fugir” do local afetado. Futuros estudos devem-se focar na utilização de outros pesticidas, para a avaliação de potenciais efeitos aditivos ou sinérgicos nos peixes. É necessário também perceber a ligação entre as alterações na capacidade natatória e de salto com a exposição ao pesticida, podendo fornecer informações úteis para ambos os campos.

Para concluir, é através dos resultados obtidos que se pode implementar medidas de gestão e conservação para os ecossistemas aquáticos mais sensíveis e conseqüentemente para as espécies nativas, com o controlo mais rigoroso das fontes de poluição pontuais e difusas, de modo também a perceber qual o tempo de residência destes contaminantes em água a fim de não causar alterações comportamentais nos peixes.

6. Bibliografia

- Ahmad, H., Yousafzai, A. M., Siraj, M., Ahmad, R., Ahmad, I., Nadeem, M. S., Ahmad, W., Akbar, N., & Muhammad, K. (2015). Pollution problem in river kabul: Accumulation estimates of heavy metals in native fish species. *BioMed research international*, 1-7.
- Ali, F. K., El-Shafai, S. A., Samhan, F. A., & Khalil, W. K. (2008). Effect of water pollution on expression of immune response genes of *Solea aegyptiaca* in Lake Qarun. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1418-1425.
- Almaça, C. (1995). Freshwater fish and their conservation in Portugal. *Biological Conservation*, 72(2), 125-127.
- Anderson, P. D., & Weber, L. J. (1975). Toxic response as a quantitative function of body size. *Toxicology and applied pharmacology*, 33(3), 471-483.
- Ariyomo, T. O., & Watt, P. J. (2012). The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish. *Animal Behaviour*, 83(1), 41–46.
- Authority, E. F. S. (2014). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flumioxazin. *EFSA Journal*, 18(9), 22.
- Awoyemi, O. M., Kumar, N., Schmitt, C., Subbiah, S., & Crago, J. (2019). Behavioral, molecular and physiological responses of embryo-larval zebrafish exposed to types I and II pyrethroids. *Chemosphere*, 219, 526–537.
- Baras, E., & Cherry, B. (1990). Seasonal activities of female barbel *Barbus barbus* (L.) in the River Ourthe (Southern Belgium), as revealed by radio tracking. *Aquatic Living Resour*, 3(4), 283-294.
- Baras, E., Lambert, H., & Philippart, J. C. (1994). A comprehensive assessment of the failure of *Barbus barbus* spawning migrations through a fish pass in the canalized River Meuse (Belgium). *Aquatic Living Resources*, 7(3), 181–189.
- Barbour, M. T., Gerritsen, J., Snyder, B. D., & Stribling, J. B. (1999). *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and Fish* (2nd ed.). Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.
- Barry, M. J., Logan, D. C., Ahokas, J. T., & Holdway, D. A. (1995). Effects of esfenvalerate pulse-exposure on the survival and growth of larval Australian crimson-spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environmental Toxicology & Water Quality*, 10(4), 267–274.

- Bartolini, T., Butail, S., & Porfiri, M. (2015). Temperature influences sociality and activity of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 98(3), 825-832.
- Beiras, R. (2018). *Marine pollution. In: Sources, Fate and Effects of Pollutants in Coastal Ecosystems* (1st ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). *Aroma compounds*. Food Chemistry (3rd ed.). Springer, Berlin.
- Bernardo, J. M., Ilhéu, M., Matono, P., Cortes, R., Ferreira, M. T., Santos, J. M., Formingo, N., Almeida P. R., & Quintela, B. (2008). Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segundo a Directiva Quadro da Água-Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola. Instituto da Água, Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território, Portugal.
- Beyruth, Z. (2008). Água, agricultura e as alterações climáticas globais - Water, agriculture and global climate changes. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária*. 2, 74-89.
- Biro, P. A., & Dingemans, N. J. (2009). Sampling bias resulting from animal personality. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 66–67.
- Biro, P. A., Post, J. R., & Parkinson, E. A. (2003). From individuals to populations: prey fish risk-taking mediates mortality in whole-system experiments. *Ecology*, 84(9), 2419–2431.
- Black, J. J. (1988). Carcinogenicity tests with rainbow trout embryos: a review. *Aquatic Toxicology*, 11(1-2), 129-142.
- Braga, R., & Pinto, P. A. (2009). Alterações climáticas e agricultura. *Inovação e tecnologia na formação agrícola*, 12, 34-56.
- Brownscombe, J. W., Nowell, L., Samson, E., Danylchuk, A. J., & Cooke, S. J. (2014). Fishing-Related Stressors Inhibit Refuge-Seeking Behavior in Released Subadult Great Barracuda. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(3), 613–617.
- Buhl, K. J., & Hamilton, S. J. (1991). Relative sensitivity of early life stages of arctic grayling, coho salmon, and rainbow trout to nine inorganics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22(2), 184-197.
- Cabral, M. J., Almeida, J., Almeida, P. R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J. M., Queirós, A. I., Rogado, L., & Santos-Reis, M. (2005). *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza, Portugal.

- Çaliskan, M., Erkmen, B., & Yerli, S. V. (2003). The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14(3), 117–120.
- Caquet, T., Lagadic, L., & Sheffield, S. R. (2000). Mesocosms in Ecotoxicology (1): Outdoor Aquatic Systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 165, 1–38.
- Cárcamo, J. G., Aguilar, M. N., Carreño, C. F., Vera, T., Arias-Darraz, L., Figueroa, J. E., Romero, A. P., Alvarez, M., & Yañez, A. J. (2017). Consecutive emamectin benzoate and deltamethrin treatments affect the expressions and activities of detoxification enzymes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191, 129-137.
- Carr, R. L., & Chambers, J. E. (1996). Kinetic Analysis of their VitroInhibition, Aging, and Reactivation of Brain Acetylcholinesterase from Rat and Channel Catfish by Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 139(2), 365–373.
- CEN, European Committee for Standardization, (2003). *Water Quality: Sampling of fish with electricity*. European Standard EN 14011, Brussels.
- Chen, X., Song, M., Qi, S., & Wang, C. (2013). Safety Evaluation of Eleven Insecticides to *Trichogramma nubilale* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1), 136–141.
- Cid, N., Bonada, N., Carlson, S., Grantham, T., Gasith, A., & Resh, V. (2017). High Variability Is a Defining Component of Mediterranean-Climate Rivers and Their Biota. *Water*, 9(1)
- Colchen, T., Teletchea, F., Fontaine, P., & Pasquet, A. (2017). Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in a fish. *Current zoology*, 63(2), 175-183.
- Coleman, K., & Wilson, D. S. (1998). Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are context-specific. *Animal behaviour*, 56(4), 927-936.
- Collares-Pereira, M. J., Alves, M. J., Ribeiro, F., Domingos, I. M., Raposo de Almeida, P., Moreira da Costa, L. D., Gante, H. F., Filipe, A. F., Aboim, M. A., Rodrigues, P., & Magalhães, M. F. (2021). *Guia dos Peixes de Água Doce e Migradores de Portugal Continental*. Edições Afrontamento, Portugal.
- Connon, R. E., Geist, J., Pfeiff, J., Loguinov, A. V., D'Abronzio, L. S., Wintz, H., Vulpe, C. D., & Werner, I. (2009). Linking mechanistic and behavioral responses to sublethal esfenvalerate exposure in the endangered delta smelt; *Hypomesus transpacificus* (Fam. Osmeridae). *BMC Genomics*, 10(1), 608.

- Crossland, N. O., & La Point, T. W. (1992). The design of mesocosm experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1-4, 1992
- Davis, M. W. (2010). Fish stress and mortality can be predicted using reflex impairment. *Fish and Fisheries*, 11(1), 1-11.
- Deanovic, L. A., Stillway, M., Hammock, B. G., Fong, S., & Werner, I. (2018). Tracking pyrethroid toxicity in surface water samples: exposure dynamics and toxicity identification tools for laboratory tests with *Hyaella azteca* (Amphipoda). *Environmental toxicology and Chemistry*, 37(2), 462-472.
- Doadrio, I. (2001). *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman R. J., Prieur-Richard A., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2005). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews*, 81(2), 163-182.
- Dwire, K. A., & Lowrance, R. R. (2006). Riparian ecosystems and buffers-multiscale structure, function, and management: introduction. *Journal of the American Water Resources Association*, 42(1), 1-4.
- Edwards, R., Millburn, P., & Hutson, D. H. (1986). Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse, and quail. *Toxicology and applied pharmacology*, 84(3), 512-522.
- Feio, M. J., & Ferreira, V. (2019). *Rios de Portugal: comunidades, processos e alterações*. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Feld, C. K., Fernandes, M. R., Ferreira, M. T., Hering, D., Ormerod, S. J., Venohr, M., & Gutiérrez-Cánovas, C. (2018). Evaluating riparian solutions to multiple stressor problems in river ecosystems — A conceptual study. *Water Research*, 139, 381–394.
- Ferreira, A. P., Ferreira, M. T., & Oliveira, J. M. (1999). *Contribuição para o estudo da idade e crescimento do barbo (Barbus bocagei Steindachner, 1865) e da boga (Chondrostoma polylepis Steindacher, 1865) no rio Mondego*. Anais do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Floyd, E. Y., Geist, J. P., & Werner, I. (2008). Acute, sublethal exposure to a pyrethroid insecticide alters behavior, growth, and predation risk in larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(8), 1780-1787.

- Foster, W. A., & Treherne, J. E. (1981). Evidence for the dilution effect in the selfish herd from fish predation on a marine insect. *Nature*, 293(5832), 466–467.
- Freeze, R. A., & Cherry, J. A. (1979). *Groundwater* (1st ed.). Prentice Hall, Inc. U.S., Englewood.
- Gavrilescu, M. (2005). Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 497–526.
- Giesy Jr, J. P. (1980). *Microcosms in ecological research select* (1st ed.). Technical Information Center, Oak Ridge.
- Giuliano, G. (2019). *Groundwater vulnerability to pesticides: an overview of approaches and methods of evaluation* (1st ed.). Pesticide risk in groundwater, Florida.
- Gonino, G., Branco, P., Benedito, E., Ferreira, M. T., & Santos, J. M. (2019). Short-term effects of wildfire ash exposure on behaviour and hepatosomatic condition of a potamodromous cyprinid fish, the Iberian barbel *Luciobarbus bocagei* (Steindachner, 1864). *Science of The Total Environment*, 665, 226-234.
- Hall, S. J., Wardle, C. S., & MacLennan, D. N. (1986). Predator evasion in a fish school: test of a model for the fountain effect. *Marine biology*, 91(1), 143-148.
- Huang, Y., Zhang, J. S., Han, X. B., Huang, T. L., & Chan, A. K. (2016). Monitoring behavioral responses of zebrafish (*Danio rerio*) as a biomarker for identifying cadmium and deltamethrin in water. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, 15(10).
- Hughes, F. M. R. (1997). Floodplain biogeomorphology. *Progress in Physical Geography*, 21(4), 501–529.
- Kumar, A., Sharma, B., & Pandey, R. S. (2007). Cypermethrin and λ -cyhalothrin induced alterations in nucleic acids and protein contents in a freshwater fish, *Channa punctatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(4), 331–338.
- Laubenstein, T., Rummer, J., Nicol, S., Parsons, D., Pether, S., Pope, S., Smith, N., & Munday, P. (2018). Correlated Effects of Ocean Acidification and Warming on Behavioral and Metabolic Traits of a Large Pelagic Fish. *Diversity*, 10(2), 35.
- Leite, T., Santos, J. M., Ferreira, M. T., Canhoto, C., & Branco, P. (2019). Does short-term salinization of freshwater alter the behaviour of the Iberian barbel (*Luciobarbus bocagei*, Steindachner 1864)? *Science of The Total Environment*, 651, 648–655.
- Liu, S.-S., Song, X.-Q., Liu, H.-L., Zhang, Y.-H., & Zhang, J. (2009). Combined photobacterium toxicity of herbicide mixtures containing one insecticide. *Chemosphere*, 75(3), 381–388.

- Lobón-Cerviá, J., & Fernández-Delgado, C. (1984). On the biology of the barbel (*Barbus barbus bocagei*) in the Jarama river. *Folia Zoologica - Praha*, 33(4), 371-384.
- López-López, T., Gil-García, M., Martínez-Vidal, J. L., & Martínez-Galera, M. (2001). Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 447(1-2), 101–111.
- Lucas, M. C., & Batley, E. (1996). Seasonal Movements and Behaviour of Adult Barbel *Barbus barbus*, a Riverine Cyprinid Fish: Implications for River Management. *The Journal of Applied Ecology*, 33(6), 1345.
- Mahmoud, A. E. A. (2015). *Effect of Different Management of Fish Ponds on Fish Productivity and Water Quality*. Benha University, Egypt.
- Mameri, D., Branco, P., Ferreira, M. T., & Santos, J. M. (2020). Heatwave effects on the swimming behaviour of a Mediterranean freshwater fish, the Iberian barbel *Luciobarbus bocagei*. *Science of The Total Environment*, 730, 139152.
- Manek, A. K., Ferrari, M. C. O., Niyogi, S., & Chivers, D. P. (2014). The interactive effects of multiple stressors on physiological stress responses and club cell investment in fathead minnows. *Science of The Total Environment*, 476-477, 90–97.
- Marigoudar, S. R., Ahmed, R. N., & David, M. (2009). Cypermethrin induced: in vivo inhibition of the acetylcholinesterase activity in functionally different tissues of the freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 91(6), 1175-1182.
- Maulvault, A. L., Santos, L. H., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., & Rosa, R. (2018). Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*). *Science of the Total Environment*, 634, 1136-1147.
- McGlashan, D. J., & Hughes, J. M. (2001). Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Dividing Range. *Journal of Fish Biology*, 59, 55-67.
- Message, R., & Greenhough, B. (2019). “But It’s Just a Fish”: Understanding the Challenges of Applying the 3Rs in Laboratory Aquariums in the UK. *Animals*, 9(12), 1075
- Navarro, S., Vela, N., & Navarro, G. (2007). An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Spanish journal of agricultural research*, (3), 357-375.

Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World* (5th ed.). John Wiley & Sons, Nova Jersey.

Odum, E. P. (1984). The mesocosm. *BioScience*, 34(9), 558-562.

Odum, E. P., Finn, J. T., & Franz, E. H. (1979). Perturbation theory and the subsidy-stress gradient. *Bioscience*, 29(6), 349-352.

Olson, J. R. (2019). Predicting combined effects of land use and climate change on river and stream salinity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*, 374(1764), 20180005.

Palmquist, K., Salatas, J., & Fairbrother, A. (2012). Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology. *Insecticides-advances in integrated pest management*, 251-278.

Park, B. J., Kyung, K. S., Choi, J. H., Im, G. J., Kim, I. S., & Shim, J. H. (2005). Environmental fate of the herbicide molinate in a rice-paddy-soil lysimeter. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 75(5), 937-944.

Peters, L. D., & Livingstone, D. R. (1995). Studies on cytochrome P4501A in early and adult life stages of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Marine Environmental Research*, 39(1-4), 5-9.

Piggott, J. J., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and evolution*, 5(7), 1538-1547.

Pinheiro, P. J., Santos, J. M., Albuquerque, A. C., & Ferreira, M. T. (2004). *Utilização de radio-telemetria no estudo de selecção de habitat do barbo-comum (Barbus bocagei) no rio Alva*. 7^o Congresso da Água, Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos.

Pritchard, V. L., Lawrence, J., Butlin, R. K., & Krause, J. (2001). Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*, 62(6), 1085-1088.

Qiu, X., Nomichi, S., Chen, K., Honda, M., Kang, I. J., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. (2017). Short-term and persistent impacts on behaviors related to locomotion, anxiety, and startle responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) induced by acute, sublethal exposure to chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 192, 148-154.

Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T., Kidd, K. A., MacComarck, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. T., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2018). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 25.

- Renick, V. C., Anderson, T. W., Morgan, S. G., & Cherr, G. N. (2015). Interactive effects of pesticide exposure and habitat structure on behavior and predation of a marine larval fish. *Ecotoxicology*, 24(2), 391-400.
- Rodriguez-Ruiz, A., & Granado-Lorencio, C. (1992). Spawning period and migration of three species of cyprinids in a stream with Mediterranean regimen (SW Spain). *Journal of fish biology*, 41(4), 545-556.
- Rowe, C. L., & Dunson, W. A. (1994). The value of simulated pond communities in mesocosms for studies of amphibian ecology and ecotoxicology. *Journal of Herpetology*, 346-356.
- Sanches, S., Silva, C., Campos, S., & Vieira, E. (2003). Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13.
- Schleier III, J. J., & Peterson, R. K. (2011). *Pyrethrins and pyrethroid insecticides*. Royal Society of Chemistry, London.
- Shaluei, F., Hedayati, A., Kolangi, H., Jahanbakhshi, A., & Baghfalaki, M. (2012). Evaluation of the acute toxicity of cypermethrin and its effect on behavioral responses of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Global Vet*, 9(2), 215-219.
- Siegler, K., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Voorhees, J. P., & Tjeerdema, R. S. (2015). Temporal and spatial trends in sediment contaminants associated with toxicity in California watersheds. *Environmental Pollution*, 206, 1-6.
- Smith, S. M., Fox, R. J., Booth, D. J., & Donelson, J. M. (2018). Stick with your own kind or hang with the locals? Implications of shoaling strategy for tropical reef fish on a range-expansion frontline. *Global change biology*, 24(4), 1663-1672.
- Srivastav, A. K., Srivastava, S. K., & Srivastav, S. K. (1997). Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 59(5), 841-846.
- Suvetha, L., Saravanan, M., Hur, J. H., Ramesh, M., & Krishnapriya, K. (2015). Acute and sublethal intoxication of deltamethrin in an Indian major carp, *Labeo rohita*: Hormonal and enzymological responses. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, 58-65.
- Tien, J. H., Levin, S. A., & Rubenstein, D. I. (2004). Dynamics of fish shoals: identifying key decision rules. *Evolutionary Ecology Research*, 6(4), 555-565.

US EPA. (2008). *Risks of Esfenvalerate Use to Federally Threatened California RedLegged Frog (Rana aurora Draytonii). Pesticide Effects Determination*. Environmental Fate and Effects Division, Office of Pesticide Programs, Washington.

Van den Brink, P. J., Tarazona, J. V., Solomon, K. R., Knacker, T., Van den Brink, N. W., Brock, T. C., & Hoogland, J. P. (2005). The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(4), 820-829.

Verhoughstraete, M. P., Martin, S. L., Kendall, A. D., Hyndman, D. W., & Rose, J. B. (2015). Linking fecal bacteria in rivers to landscape, geochemical, and hydrologic factors and sources at the basin scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10419-10424.

Villaverde, J., Kah, M., & Brown, C. D. (2008). Adsorption and degradation of four acidic herbicides in soils from southern Spain. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(7), 703-710.

Waldron, A. C. (1992). *Pesticides and groundwater contamination*. The Ohio State University, Ohio.

Wang, X., Martínez, M. A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martínez, M., Rodríguez, J. L., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism: A review. *Environmental research*, 149, 86-104.

Ward, A. J., Duff, A. J., Horsfall, J. S., & Currie, S. (2008). Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1630), 101-105.

Waxman, M. F. (1998). *The agrochemical and pesticides safety handbook* (1st ed.). Taylor & Francis, Reino Unido.

Werner, E. E., & Anholt, B. R. (1993). Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity. *The American Naturalist*, 142(2), 242-272.

Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570.

Wilson, D. S., Clark, A. B., Coleman, K., & Dearstyne, T. (1994). Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in ecology & evolution*, 9(11), 442-446.

Wu, Y., Rene, E. R., Zhou, M., & Tiwari, A. (2020). Non-point source pollution control and aquatic ecosystem protection-An introduction. *Bioresource Technology*, 316,123956-123956.

Yaji, A. J., Auta, J., Oniye, S. J., Adakole, J. A., & Usman, J. I. (2011). Effects of cypermethrin on behavior and biochemical indices of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 10(2).

Yakoub, K. H., & Azzedine, H. (2019). Standardized system for evaluating groundwater pollution. *MATEC Web of Conferences*, 295, 1-7.