

**Avaliação dos efeitos do inseticida piretróide esfenvalerato  
na atividade comportamental de uma espécie piscícola  
exótica, o alburno (*Alburnus alburnus*), num sistema de  
mesocosmos**

**Margarida Pereira de Oliveira**

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(a) Instituto Superior de  
Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Paulo José de Lemos Branco, Investigador júnior do(a) Instituto Superior  
de Agronomia da Universidade de Lisboa;  
Doutora Susana Cristina Amador Dias Amaral.

*“Who are we to swoop in, play God, and then continue  
on our way without the slightest consideration of the  
long-term effects of our actions?”*

***Kate Mulgrew as Capitan Janeway,  
Star Trek Voyager***

## Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, aos meus professores orientadores José Maria Santos e Paulo Branco, pelos conhecimentos transmitidos ao longo deste trabalho, pela paciência e pelas sugestões e correções sugeridas nas revisões do mesmo. Agradeço também à Professora Teresa Ferreira, que me deu a conhecer este tema, e à Professora Emília, que sugeriu o esfenvalerato como pesticida a utilizar e se disponibilizou para o que fosse necessário.

O meu especial obrigado à minha colega e amiga Inês, que viveu esta experiência comigo e que foi o meu apoio em toda esta caminhada, incluindo na pesquisa, nos ensaios e na escrita.

Aos meus amigos e colegas do ISA, nomeadamente à Fabíola, à Eva, à Rita, à Joana, à Francisca e aos três Tiagos, pela amizade, pelos convívios e pelo companheirismo, que serviram muitas vezes de apoio e de motivação para avançar com este trabalho.

À minha família, que, para além do financiamento de todos estes anos de estudo, me incentivou a continuar e a querer sempre fazer o melhor possível. Um especial obrigado ao meu pai, o meu exemplo de determinação, que nunca hesitou em prestar-me auxílio em tudo o que precisei para a elaboração da tese, e à minha tia Graça, que também foi uma peça essencial na finalização deste trabalho. Um obrigado também à Joana Marques, que considero como parte da família, por toda a dedicação, amizade e carinho que sempre recebi.

Obrigada, também, ao Daniel, pelo tempo disponibilizado à revisão da minha tese.

E, por fim, um obrigado a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a crescer e a progredir enquanto estudante, pessoa e cidadã e que sempre me acompanharam durante este percurso.

## Resumo

A crescente utilização de pesticidas é cada vez mais uma preocupação ambiental, devido aos seus efeitos adversos em vários organismos aquáticos, nomeadamente nos peixes de água doce. Contudo, poucos são os trabalhos que se focam nos efeitos sub-letais destes contaminantes, sobretudo em cipriniformes, uma das ordens com maior número de espécies. Este estudo baseou-se na avaliação dos efeitos sub-letais de um pesticida numa espécie piscícola exótica em Portugal – o alburno (*Alburnus alburnus*). Os peixes foram expostos a três concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L) durante duas horas e o seu comportamento foi avaliado em ensaios de mesocosmos. As métricas comportamentais, avaliadas a cada 3 minutos, incluíram: i) a atividade de rotina, classificada como letargia, natação (procura), natação (fuga) ou mudanças direcionais, ii) a ousadia, avaliada pela proporção de tentativas de transposição da rampa a montante e iii) a coesão de cardume, classificada de 1 a 4 de acordo com a distância entre os peixes. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as três concentrações de esfenvalerato para cada uma das métricas, sendo que: i) os peixes passaram a maior parte do tempo em natação (procura) (59,6% no controlo, 64,6% na concentração baixa e 69,2% na concentração alta), ii) a percentagem de tentativas de transposição da rampa foi de 33,20% para o controlo, 34,85% para a concentração baixa e 31,95% para a concentração alta e iii) os peixes passaram a maior parte do tempo em coesão máxima (nível 4) (controlo: 82%; concentração baixa: 85%; concentração alta: 73%). Os resultados mostraram que os exemplares de alburno não foram afetados pela exposição ao esfenvalerato, o que lhes confere, à partida, uma maior vantagem competitiva sobre espécies nativas. Com base nos resultados, e nas potenciais implicações destes, são sugeridas medidas de gestão e futuras linhas de investigação.

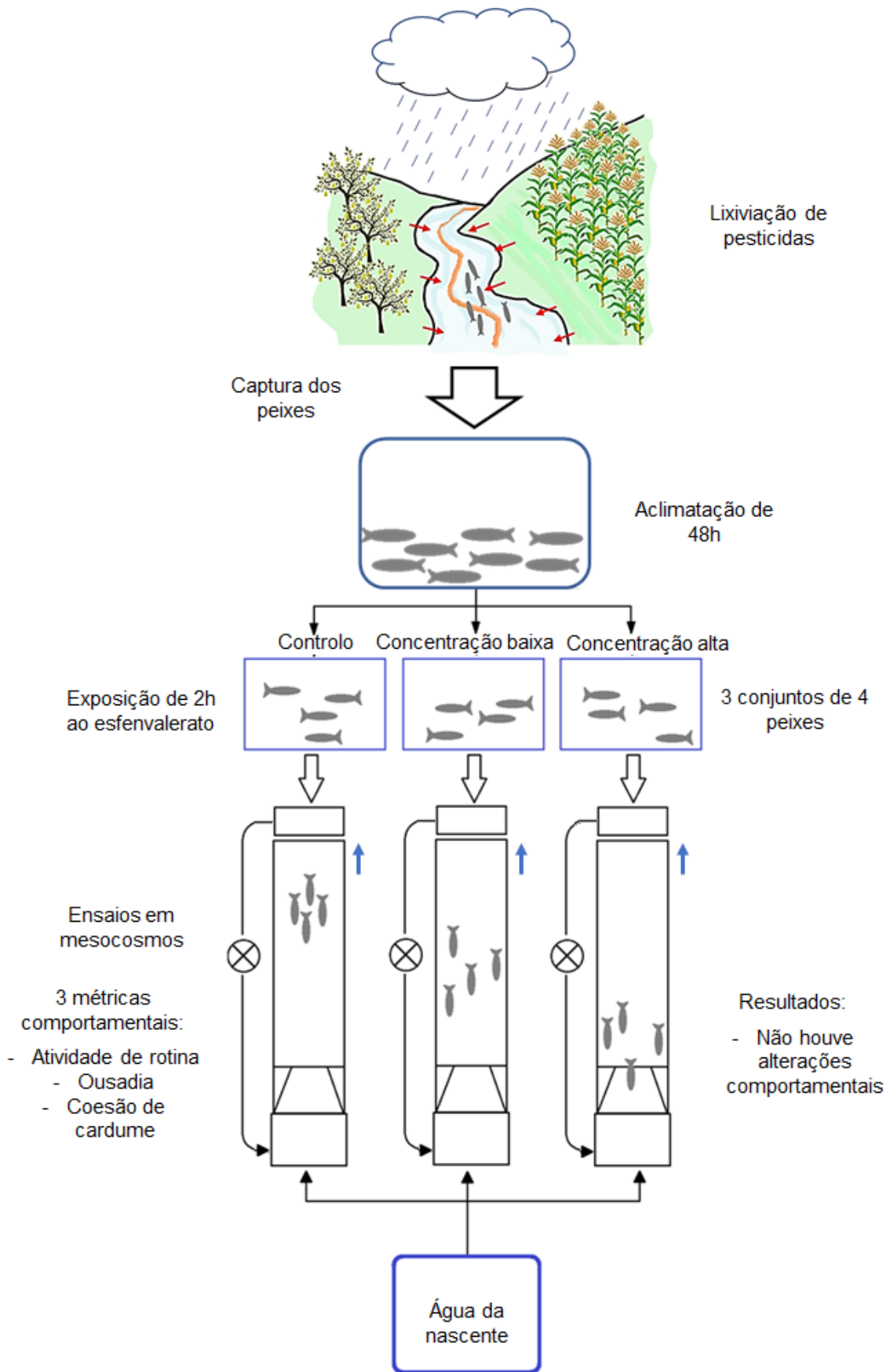
Palavras-chave: piretróide esfenvalerato, alburno, mesocosmos, efeitos sub-letais, atividade comportamental.

## Abstract

The growing use of pesticides is an increasingly environmental concern, due to their adverse effects on various aquatic organisms, namely freshwater fish. However, there are few studies that focus on the sub-lethal effects of these contaminants, especially in cypriniforms, which constitute one of the orders with the largest number of species. This study aimed to evaluate the sub-lethal effects of a pesticide on a fish species, exotic in Portugal, the bleak (*Alburnus alburnus*). The fish were exposed to three concentrations of the pyrethroid insecticide esfenvalerate (control 0,0 µg/L; low concentration 1,2 µg/L; high concentration 2,0 µg/L) for two hours, and their behavior was later evaluated in mesocosm experiments. Behavioral metrics, assessed every 3 minutes, included: i) routine activity, classified as lethargy, swimming (searching), swimming (fleeing) or directional changes, ii) boldness, measured by the proportion of attempts to cross the ramp upstream and iii) the shoal cohesion, classified from 1 to 4 according to the distance between the fish. There were no statistically significant differences between the three esfenvalerate concentrations for each of the metrics: i) the fish spent most of their time swimming (searching) (59.6% at the control, 64.6% at the low concentration and 69.2% at the high concentration), ii) the percentage of attempts to cross the ramp was 33.20% for the control, 34.85% for low concentration and 31.95% for high concentration and iii) fish spent most of the time in maximum cohesion (index 4), i.e. all fish at a distance less than the length of one fish of each other (control: 82%; low concentration: 85%; high concentration: 73%). The results showed that bleak behavior was not affected by previous exposure to esfenvalerate, which grant them a greater competitive advantage over native species. Based on the results and their potential implications, management measures and future lines of research are suggested.

Keywords: pyrethroid esfenvalerate, bleak, mesocosm, sub-lethal effects, behavioral activity.

## Resumo gráfico



## Índice geral

1. Introdução .....	1
1.1 Fatores de pressão nos ecossistemas aquáticos .....	1
1.2 Alburno ( <i>Alburnus alburnus</i> ) .....	2
1.3 Pesticidas .....	3
1.3.1 Problemas associados à utilização de pesticidas .....	3
1.3.2 Toxicidade dos pesticidas .....	4
1.3.3 Inseticida piretróide esfenvalerato .....	5
1.4 Objetivo .....	6
2. Materiais e Métodos .....	8
2.1 Conformidade com os padrões éticos .....	8
2.2 Caracterização do pesticida .....	8
2.3 Pré-ensaios .....	9
2.4 Ensaios .....	11
2.4.1 Captura e transporte dos peixes .....	11
2.4.2 Preparação do mesocosmos .....	12
2.4.3 Delineamento experimental .....	13
2.5 Análise de dados .....	18
3. Resultados .....	19
3.1 Pré-ensaios .....	19
3.2 Ensaios .....	19
3.2.1 Atividade de rotina .....	21
3.2.2 Ousadia .....	22
3.2.3 Coesão de cardume .....	23
3.3 Pós-ensaios .....	24
4. Discussão .....	26
5. Conclusão .....	30
Referências bibliográficas .....	31

## Lista de figuras

- Figura 1.1.** Alburno (*Alburnus alburnus*). Fonte: <https://wiki.fishingplanet.com/> ..... 2
- Figura 2.1.** Inseticida Piretróide Esfenvalerato (SUMIFIVE ® PLUS) utilizado nos pré-ensaios e nos ensaios. .... 8
- Figura 2.2.** Carpas no tanque de aclimação (tanque de 1100 L; Filtro Canister FX5 de alto desempenho, Fluval, Quebec, Canadá), durante 48 horas. .... 10
- Figura 2.3.** Captura de peixes, recorrendo ao método de pesca elétrica (Hans Grassl IG-200). .... 12
- Figura 2.4.** Sistema de mesocosmos do ISA, constituído por 6 canais artificiais externos de zinco. .... 13
- Figura 2.5.** Tanque de aclimação, no qual os peixes permaneceram durante 48 horas antes dos ensaios. .... 14
- Figura 2.6.** Tanques de 50 L, onde os peixes foram expostos, durante 2 horas, às três concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato. .... 15
- Figura 2.7.** Representação esquemática dos ensaios no sistema de mesocosmos: **a)** canal do mesocosmos (I – tanque a jusante, para onde verte a água; II – zona de aclimação, localizada a jusante do canal (0,6 x 0,4 m); III – canal do mesocosmos, no qual os peixes circulam livremente; IV – rampa; V – tanque a montante (capacidade de 70 L, um para cada canal); VI – bomba ligada ao tanque a jusante, que redireciona a água através de tubos de PEAD (Polietileno de Alta Densidade) de volta ao tanque a montante, permitindo a recirculação do fluxo em regime fechado; VII – tanque central de 3000 L, que fornece água da nascente natural); **b)** aclimação dos peixes na secção a jusante do canal, durante 10 minutos; **c)** movimentação livre dos peixes ao longo do canal, após a remoção da rede de aclimação; **d)** tentativas de transposição da rampa a jusante do canal, que representam a ousadia dos peixes. .... 16
- Figura 2.8.** Medição do comprimento dos peixes com um ictiómetro (I) e pesagem dos mesmos com uma balança (II). .... 17
- Figura 2.9.** Medição da velocidade do fluxo da água dos canais, com o molinete (Global Water Instrumentation, Inc., USA, mod. FP-101). .... 18
- Figura 3.1.** Frequência relativa (%) dos diferentes tipos de atividade de rotina (letargia, natação (procura), natação (fuga) e mudanças direcionais) executadas pelos alburnos nos canais experimentais do mesocosmos, após exposição prévia (2 horas) a diferentes níveis de

concentração do inseticida piretróide esfenvalerato (cinzento claro – controlo 0,0 µg/L; cinzento escuro – concentração baixa 1,2 µg/L; e preto – concentração alta 2,0 µg/L). .....22

**Figura 3.2.** Frequência relativa (%) do número de tentativas de transposição da rampa, localizada a montante dos canais experimentais do mesocosmos, por parte dos exemplares de alburno, após exposição prévia (2 horas) a diferentes níveis de concentração do inseticida piretróide esfenvalerato (cinzento claro – controlo 0,0 µg/L; cinzento escuro – concentração baixa 1,2 µg/L; e preto – concentração alta 2,0 µg/L). .....23

**Figura 3.3.** Frequência relativa (%) dos diferentes estados de coesão do cardume (classificada como: 1- nenhum peixe agregado a uma distância menor do que o comprimento de um peixe; 2- dois peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe; 3- três peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe e 4- todos os peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe) dos exemplares de alburno, durante os ensaios experimentais no 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 inseticida piretróide esfenvalerato.....24

## Lista de tabelas

- Tabela 3.1.** Parâmetros RAMP (*Reflex Action Mortality Predictors*) (Davis, 2010) dos exemplares de carpa, após a exposição prévia de 2 horas ao inseticida piretróide esfenvalerato, classificados como: 0- nenhum peixe alterado e 1- pelo menos um peixe alterado (concentração muito baixa 0,0625 µg/L; concentração baixa 0,250 µg/L; concentração média 1,2 µg/L; e concentração muito alta 2,0 µg/L). .....19
- Tabela 3.2.** Parâmetros físico-químicos da água (Média ± Desvio Padrão) medidos após 2 horas de exposição dos exemplares de alburno a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L). .....20
- Tabela 3.3.** Parâmetros físico-químicos da água e profundidade (Média ± Desvio Padrão) dos canais, após os ensaios experimentais e prévia exposição dos exemplares de alburno a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L), cada um com valores de oxigénio dissolvido de 9,02 mg/L, 9,83 mg/L e 9,75 mg/L, respetivamente, e com velocidade da água igual a 0,10 m/s. ....20
- Tabela 3.4.** Parâmetros biométricos dos exemplares de alburno (Média ± Desvio Padrão) após os ensaios experimentais e prévia exposição dos peixes a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L). .....21
- Tabela 3.5.** Indicadores RAMP (*Reflex Action Mortality Predictors*) (Davis, 2010) dos exemplares de alburno, após a exposição prévia de 2 horas ao inseticida piretróide esfenvalerato, classificados como: 0- não alterado e 1- alterado (Controlo 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L). .....25

## Lista de abreviaturas

**CEN** – *European Committee for Standardization*

**EU** – *European Union* (União Europeia)

**FELASA** – *Federation for European Laboratory Animal Science Associations*

**ICNF** – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

**ISA** – Instituto Superior de Agronomia

**K<sub>ow</sub>** – Coeficiente de partição octanol-água

**LC<sub>50</sub>** – Concentração letal para 50% da população

**OD** – Oxigénio dissolvido

**PEAD** - Polietileno de alta densidade

**POPs** – Poluentes orgânicos persistentes

**RAMP** – *Reflex Action Mortality Predictors*

## 1. Introdução

### 1.1 Fatores de pressão nos ecossistemas aquáticos

Os ecossistemas aquáticos dulçaquícolas, como rios e ribeiras, são dos mais diversos do mundo (Dudgeon, 2019) e fornecem vários serviços de ecossistemas essenciais, como a disponibilidade de água doce, alimentação, regularização do clima, purificação da água, transporte de nutrientes e valores recreativos (Leite, 2018; Green et al., 2015). Os ecossistemas ribeirinhos estão entre os mais degradados pelo Homem e são, por isso, dos mais ameaçados (Branco, 2013), estando sujeitos a múltiplas pressões: uso do solo, distúrbios hidrológicos, poluição, alterações climáticas, sobre-exploração e espécies exóticas (Leite, 2018).

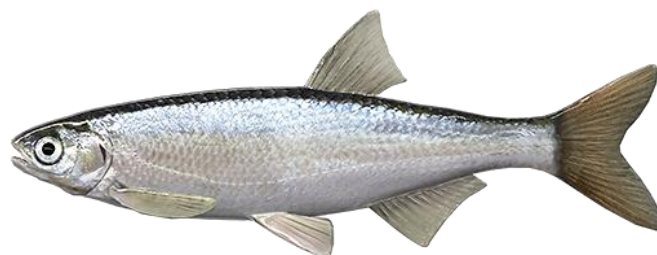
Entre os vários organismos aquáticos, os peixes são bastante sensíveis à contaminação ambiental da água (Choudhury, 2018). Estes têm recebido especial atenção, comparativamente a plantas e microrganismos, devido à sua importância económica e pela facilidade em trabalhar com estes organismos em laboratório (Schäfer et al., 2011). Os peixes têm a capacidade de absorver e concentrar toxinas e contaminantes diretamente da água ou indiretamente de outros organismos, como peixes mais pequenos, invertebrados ou vegetação aquática (Polat et al., 2016), devido aos processos de bioacumulação e biomagnificação (Dang, 2016).

Dentro dos principais impulsionadores da perda de biodiversidade, à escala global, encontram-se as invasões biológicas. Por todo o mundo têm sido introduzidos peixes não-nativos, provocando efeitos adversos nos ecossistemas de água doce, sobretudo espécies invasoras, que provocam alterações significativas nas comunidades nativas (Almeida et al., 2014). Os impactos em comunidades nativas provocados por espécies piscícolas invasoras resultam de hibridizações, transporte de doenças, alterações na cadeia alimentar, predação e competição interespecífica (Almeida & Grossman, 2012). A invasão de espécies exóticas pode levar à extinção de espécies nativas e à homogeneização das comunidades piscícolas (Wilcove et al., 1998). As espécies invasoras bem-sucedidas prosperam em diferentes condições ambientais e podem ser favorecidas pela degradação ambiental (Milardi et al., 2018; Crawley, 1986). O ambiente desempenha um papel importante na regulação da distribuição das espécies, podendo o sucesso das invasões de espécies dever-se a um efeito sinérgico entre as mudanças nas condições ambientais e a espécie exótica, independentemente das comunidades nativas (Moyle & Light, 1996). Os rios ibéricos têm vindo a sofrer introduções de várias espécies desde o século XVII (Anastácio et al., 2019), o que tem sido apontado como um dos principais fatores responsáveis por afetar a sobrevivência das espécies nativas, na sua maioria endémicas (Costa et al., 2021; Elvira &

Almodóvar, 2009). Na Península Ibérica, as espécies introduzidas estão bastante dispersas e continuam a expandir as suas áreas de distribuição (Ribeiro & Leunda, 2012). Muitas introduções tiveram um objetivo específico, como piscicultura ou pesca desportiva, e muitas foram acidentais, nomeadamente a partir de espécies que se terão deslocado de Espanha pelos rios internacionais ou da fuga de exemplares de aquaculturas (Godinho, 2006).

## 1.2 Alburno (*Alburnus alburnus*)

O alburno (*Alburnus alburnus*) (Figura 1.1) é um cipriniforme leuciscídeo nativo de quase toda a Europa e da Ásia, sendo uma espécie exótica invasora em Portugal. O seu período de reprodução é de abril a agosto e apresenta uma longevidade de 5 anos no meio natural. Foi introduzido na Península Ibérica em 1992, para fins de pesca desportiva e como isco-vivo na pesca de outras espécies, tendo invadido praticamente toda esta região em menos de duas décadas. Habita preferencialmente ambientes lênticos, como albufeiras, e rios de médio e grande porte, onde se alimenta de organismos macroinvertebrados, zooplâncton e algas (Collares-Pereira et al., 2021). Atualmente, os alburnos estão dispersos por vários cursos de água ibéricos, cujo sucesso se explica pela sua facilidade de adaptação às condições locais (Ferreira et al., 2007) e, por sua vez, a uma grande variedade de ecossistemas mediterrânicos, incluindo ambientes lênticos e lóticos. É uma espécie gregária e é conhecida por ser tolerante a diversas pressões antropogénicas, como a degradação do habitat e da qualidade da água (Maceda-Veiga & de Sostoa, 2011), o que lhe confere uma capacidade de adaptação e sobrevivência superior, comparativamente a outras espécies, nomeadamente espécies nativas (Almeida et al., 2014). É um potencial agente de transmissão de doenças e parasitas às espécies nativas, com as quais pode hibridar e causar impactos a nível genético (Collares-Pereira et al., 2021).



**Figura 1.1.** Alburno (*Alburnus alburnus*). Fonte: <https://wiki.fishingplanet.com/>

## **1.3 Pesticidas**

### **1.3.1 Problemas associados à utilização de pesticidas**

A intensificação das atividades humanas nos ecossistemas de água doce ameaça a qualidade da água e a biodiversidade desses sistemas (Leite, 2018). A crescente utilização de pesticidas é cada vez mais uma preocupação ambiental, devido aos seus efeitos adversos em vários organismos. Nos sistemas fluviais existe uma direccionalidade inerente promovida pelo fluxo de água, em que as condições presentes a montante influenciam as condições e processos que ocorrem a jusante (Allan et al., 1997). Tanto cidades como áreas agrícolas provocam escoamento de pesticidas e outros contaminantes, atingindo os cursos de água envolventes, acabando por se acumular nos sedimentos e nos seres vivos (McGourty et al., 2009). Entre os produtos químicos antropogénicos, os pesticidas são os que levantam mais problemas, uma vez que são utilizados especificamente para controlar plantas ou organismos indesejados, podendo afetar simultaneamente os organismos-alvo e os não-alvo. Vinsando o aumento da produtividade agrícola, o uso generalizado de pesticidas vai aumentando, nomeadamente os herbicidas, inseticidas e fungicidas (Santana et al., 2021). Durante as chuvadas, aumenta a presença de pesticidas em ambientes aquáticos dulçaquícolas, através da lixiviação e drenagem destes compostos químicos, o que sugere que existem variações sazonais nos níveis de contaminação (Meite et al., 2018). Estima-se que aproximadamente 300 mil milhões de quilogramas de compostos sintéticos usados em diversas indústrias entrem nestes ecossistemas anualmente (Mensah et al., 2014).

As concentrações de pesticidas em ambientes perturbados poderão ser elevadas o suficiente para matar certos organismos (Hatakeyama et al., 1990), afetando não só indivíduos, mas também causando impactos ao nível das populações (Baldwin et al., 2009) e modificando a estrutura e a composição das comunidades naturais (Hatakeyama et al., 1990; Helgen et al., 1988). Para além de poderem causar mortalidade, podem também inibir enzimas importantes, reduzir o crescimento, aumentar a suscetibilidade a doenças (Santana et al., 2021) e, ainda, alterar o comportamento dos peixes. As alterações comportamentais induzidas por contaminantes incluem mudanças nas preferências, no nível de atividade, alimentação, desempenho, aprendizagem, predação, competição, reprodução e interações sociais (Weis & Candelmo, 2012; Scott & Sloman 2004; Fleeger et al., 2003;). Estas mudanças poderão ter consequências significativas na aptidão, sobrevivência e reprodução individual. É ainda reconhecido que muitos compostos podem comprometer a capacidade de natação de peixes e de outros animais aquáticos (Werner & Moran, 2008), podendo levar a uma maior vulnerabilidade face aos predadores.

Vários estudos indicam que os pesticidas provenientes do escoamento agrícola alteram a função neurológica, a atividade, a memória espacial e o comportamento dos peixes face a predadores (p.e. Swank et al., 2021; Connon et al., 2009; Floyd et al., 2008; Werner & Moran, 2008). No entanto, os efeitos destes produtos no seu comportamento permanecem ainda pouco conhecidos. Os efeitos dos pesticidas nos peixes dependem do estágio de vida destes, da concentração e da duração de exposição. Uma exposição mais longa ou, ainda, exposições a concentrações mais elevadas podem conduzir a efeitos mais acentuados (Schäfer et al., 2011).

### **1.3.2 Toxicidade dos pesticidas**

Conseguir identificar os efeitos sub-letais de pressões ambientais não apenas nos indivíduos, mas também em populações é ainda um grande desafio na área da ecotoxicologia (Connon et al., 2009). Para além de poderem afetar a sobrevivência dos organismos, os contaminantes podem interferir na aptidão ecológica das espécies através de efeitos sub-letais fisiológicos, comportamentais ou imunológicos (Connon et al., 2009). Os mecanismos de toxicidade de pesticidas, a nível molecular, funcionam de maneira diferente dependendo da espécie e dos tecidos expostos. Entre os diferentes grupos de animais que existem em ecossistemas dulçaquícolas, os peixes são os mais conhecidos pela sua sensibilidade (na reprodução e desenvolvimento) à toxicidade de pesticidas (Yang et al., 2021). Em muitos casos, a toxicidade dos pesticidas resulta em neurotoxicidade, distúrbios endócrinos e reprodutivos e ainda efeitos carcinogénicos (Lushchak et al., 2018). Apesar da toxicidade dos pesticidas para os peixes, os seus efeitos no comportamento da atividade destes organismos têm sido raramente investigados, quer em espécies nativas, quer em exóticas – é expectável que a tolerância destas últimas seja maior, por serem espécies geralmente mais plásticas e tolerantes à degradação ambiental (Segurado et al., 2011) – sabendo-se que pode causar efeitos sub-letais e alterações comportamentais (Baldwin et al., 2009). Estes produtos químicos, devido à sua lipofilicidade, acumulam-se em órgãos de peixes e outros animais aquáticos (Schäfer et al., 2011). Utilizando-os como alimento, os humanos são expostos a concentrações ainda mais elevadas do que as detetadas no meio aquático, tendo-se evidenciado uma relação direta com o aumento do risco de contrair doenças pulmonares, diabetes e cancro (Santana et al., 2021; Cuevas et al., 2018).

Os inseticidas são o maior grupo de pesticidas (Figueiredo, 2014). Dentro dos inseticidas, os mais utilizados são os organofosforados, os piretróides e os carbamatos (Santana et al., 2021). A utilização de piretróides é cada vez mais frequente (Vieira & dos Reis Martinez, 2018), sendo que estes apresentam uma maior eficácia enquanto inseticidas, quando comparados com os organofosforados e carbamatos. Os piretróides são inseticidas sintéticos derivados das piretrinas (Miao et al., 2017), sendo obtidos a partir dos princípios

ativos presentes nos extratos das flores secas de Crisântemo (flores do piretro) (Corcellas et al., 2012). Estes neurotóxicos são altamente hidrofóbicos ( $\log K_{OW}$  4-27) e a sua forte afinidade pela fase sólida resulta numa rápida aderência aos sedimentos e a outras superfícies (Lao et al., 2012). Os piretróides, utilizados há muitos anos no controlo de pragas, são bastante eficazes em concentrações baixas (Oros & Werner, 2005). No entanto, estão presentes em concentrações tóxicas nas águas superficiais de áreas agrícolas e urbanas em todo o mundo (Deanovic et al., 2013). Os vários tipos de piretróides apresentam o mesmo modo de ação, e são divididos em dois tipos (tipo I e tipo II), consoante a sua estrutura química. A diferença entre eles está na intensidade do efeito, que é mais pronunciado para os piretróides do tipo II (Liang et al., 2013). Os do tipo I são menos tóxicos quando a temperatura aumenta, contrariamente aos do tipo II que têm um efeito inseticida mais elevado (Figueiredo, 2014).

A toxicidade aguda é definida como uma redução significativa na sobrevivência dos organismos expostos a um determinado composto e num determinado período de tempo relativamente curto (minutos a dias). É expressa como a concentração letal para metade de uma população (LC<sub>50</sub>). Para os piretróides, os valores de LC<sub>50</sub> – para 96 horas – conhecidos para várias espécies de peixes, insetos aquáticos e crustáceos encontram-se abaixo de 1 µg/L (Werner & Moran, 2008). Já os efeitos tóxicos sub-letais são aqueles que ocorrem em níveis de exposição abaixo das concentrações que causam mortalidade. Estes podem ter consequências graves para a aptidão, reprodução e sobrevivência dos organismos, podendo, por sua vez, levar a efeitos ao nível populacional (Werner & Moran, 2008). No meio aquático, os piretróides atuam no sistema nervoso central dos organismos, provocando efeitos tóxicos sobretudo nos peixes (Çaliskan et al., 2003). Como os piretróides são neurotoxinas potentes, a atividade comportamental pode estar entre os parâmetros mensuráveis mais sensíveis e ecologicamente relevantes para avaliar os efeitos tóxicos sub-letais (Werner & Moran, 2008). Vários estudos revelam que os piretróides são altamente tóxicos no meio aquático, alterando o comportamento de algumas espécies, como peixes e anfíbios. Para a espécie piscícola *Oryzias latipes*, a concentração na água de piretróides de 1 µg/L de deltametrina ou 1 µg/L de cipermetrina é suficiente para afetar a natação (Figueiredo, 2014). Outras espécies que revelaram efeitos sub-letais da exposição aguda à cipermetrina no comportamento de natação foram: *Danio rerio*, *Channa punctatus*, *Oncorhynchus mykiss* e *Lepomis macrochirus* (Palmquist et al., 2012). Estes efeitos sub-letais incluíram natação rápida e errática, perda parcial/completa de equilíbrio, espasmos na mandíbula, respiração acelerada, letargia e escurecimento na pigmentação.

### **1.3.3 Inseticida piretróide esfenvalerato**

Com o aumento da resistência aos inseticidas organofosforados por parte dos organismos-alvo, o uso de piretróides, como o esfenvalerato (tipo II), tem aumentado

rapidamente (Epstein et al., 2000). O esfenvalerato é utilizado em diversas culturas, como o tomateiro, a batateira, árvores de fruta (macieira, pereira e videira) e ainda em culturas de algodão, centeio, cevada, entre outras, cada uma com diferentes intervalos de segurança recomendados (em dias), de acordo com a Diretiva 2005/396/CE (Cavaco & Henriques, 2013). Os piretróides têm um baixo tempo de semi-vida, não havendo, por isso, longa persistência no meio ambiente. O esfenvalerato é um ciano-piretróide dos de mais difícil degradação. No entanto, uma possível via de degradação de piretróides no solo é a fotólise. Condições experimentais indicam que o tempo de semi-vida do esfenvalerato num solo à luz solar é de 7,8-100,0 dias, ao passo que num solo em ambiente escuro é de 150,0-553,4 dias (Palmquist et al., 2012).

Vários estudos apontam para que a exposição ao esfenvalerato possa afetar a eclosão dos ovos e a viabilidade dos indivíduos larvares (Werner et al., 2002), assim como provocar sinais de comportamento de natação alterado, comprovados em peixes da família *Atherinopsidae* (Renick et al., 2015), em Osmerídeos (Connon et al., 2009) e até mortalidade, como comprovada em estados larvares da espécie *Oncorhynchus mykiss* (Barry et al., 1995). As larvas de peixe são bastante sensíveis ao esfenvalerato, como as da espécie *Pimephales promelas*, que mostrou não só alterações na natação, como também uma maior suscetibilidade à predação (Floyd et al., 2008). A mortalidade poderá não ocorrer de imediato quando a duração de exposição é curta (horas). Por exemplo, as larvas da espécie *Pimephales promelas* demonstraram alterações na natação após a exposição de 4 horas a 0,7 µg/L de esfenvalerato. Com um período de recobro de 20 horas em água de controlo, a LC<sub>50</sub> foi de 2.04 µg/L de esfenvalerato (Werner & Moran, 2008).

A concentração, tempo e frequência de exposição são fatores muito importantes que afetam a toxicidade. Uma exposição contínua de certa duração poderá originar efeitos mais tóxicos do que várias exposições dentro do mesmo período de tempo. Por outro lado, exposições de baixas concentrações e longa duração podem não causar efeitos, enquanto exposições de elevadas concentrações e de curta duração podem ser suficientes para causar impactos populacionais (Werner & Moran, 2008).

#### **1.4 Objetivo**

A excessiva utilização de pesticidas levou à elaboração de vários estudos que investigam como e em que medida estes compostos exercem toxicidade nos organismos aquáticos, nomeadamente ao nível neurológico (Santana et al., 2021). Estes estudos são muitas vezes realizados em sistemas de mesocosmos (Mameri et al., 2020; Finnegan et al., 2018; Rimet & Bouchez, 2011; Heckmann & Friberg, 2005). Os mesocosmos são estruturas experimentais que simulam o ambiente natural e permitem fazer ensaios com animais

selvagens em condições parcialmente controladas (Gonino et al., 2019). Estudos levados a cabo nestas estruturas têm como vantagem o controlo da maior parte dos fatores ambientais (p.e., turbulência, luz, nutrientes), sendo mais fácil avaliar o efeito dos pesticidas nos organismos, controlando os fatores causadores de ruído (Rimet & Bouchez, 2011). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de uma espécie exótica em Portugal – o alburno (*Alburnus alburnus*) – num sistema de mesocosmos, após exposição prévia (2 horas) a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (um controlo, i.e., sem adição de pesticida, uma concentração baixa e uma mais elevada). Os parâmetros comportamentais avaliados foram: i) a atividade de rotina (Brownscombe et al., 2014), classificada como letargia, natação (procura), natação (fuga) ou mudanças direcionais; ii) a ousadia, ou seja, a vontade de assumir riscos (Laubenstein et al., 2018), avaliada pela proporção de tentativas de transposição da rampa a montante e iii) a coesão de cardume, classificada de acordo com o número de peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe (Manek et al., 2014). Ecologicamente, estas métricas são muito importantes, pois estes comportamentos conferem aos peixes a capacidade de sobreviver nos rios, desde a procura de novos locais favoráveis para refúgio e desova (Laubenstein et al., 2018) até à sobrevivência em grupo (Mameri et al., 2020). Espera-se que, com o aumento de concentração do pesticida, os peixes demonstrem: i) uma menor atividade (i.e., uma maior proporção de tempo passado em letargia), ii) menor ousadia e iii) menor coesão de cardume. No entanto, o facto de o alburno ser uma espécie exótica em Portugal, e teoricamente mais tolerante e plástica (Vinyoles et al., 2007), leva a crer que esta espécie seja mais tolerante à exposição ao esfenvalerato, quando comparada com uma espécie nativa. Esta potencial tolerância poderá causar impactos na fauna nativa, ao nível da estrutura das comunidades (Elvira & Almodóvar, 2009), uma vez que pode conferir vantagens competitivas a espécies exóticas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Conformidade com os padrões éticos

Todos os procedimentos que envolveram a captura de peixes no seu ambiente natural, o seu alojamento e ensaios foram realizados em conformidade com as normas europeias (Diretiva 2010/63/EU) e com a legislação portuguesa, mais especificamente com o Decreto-Lei 113/2013, de 7 de agosto, artigo 35, n.º 5, que transpõe a Diretiva Europeia para ensaios com animais.

As licenças (n.º 299/2021/CAPT e 300/2021/CAPT) e credenciais (n.º 38-A/2021 e 39/2021) de captura, manuseamento, e transporte de peixes foram emitidas pelo Instituto Português de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). O acondicionamento e os ensaios experimentais foram coordenados por J. M. Santos, detentor de uma certificação FELASA nível C ([www.felasa.eu](http://www.felasa.eu)) para dirigir experiências com animais. Neste sentido, todos os procedimentos necessários para a execução deste estudo foram autorizados e realizados com o mínimo *stress* possível para os peixes.

### 2.2 Caracterização do pesticida

O inseticida piretróide esfenvalerato adquirido tem como nome comercial Flower's SUMIFIVE® PLUS (Figura 2.1) e apresenta-se na forma de óleo e emulsão viscosa, com 15 mL de volume e 5% (p/v), isto é, com uma concentração de 50 g/L.



**Figura 2.1.** Inseticida Piretróide Esfenvalerato (SUMIFIVE® PLUS) utilizado nos pré-ensaios e nos ensaios.

### 2.3 Pré-ensaios

Na ausência de bibliografia relativa à forma como a ordem de peixes cipriniformes, e em particular a presente espécie (família *Leuciscidae*), reage em termos comportamentais à presença do referido inseticida, foram levados a cabo um conjunto de pré-ensaios que tiveram como objetivo aferir qual ou quais as concentrações que têm efeitos ao nível do comportamento nos peixes. Assim, as concentrações escolhidas para os pré-ensaios foram de 0,0625, 0,250, 1,2 e 2,0 µg/L. A concentração de 0,0625 µg/L foi utilizada por Connon et al. (2009), que evidenciou alterações no comportamento de um osmerídeo, referindo também efeitos comportamentais a partir da concentração de 0,250 µg/L, assim como no estudo realizado por Renick et al. (2015). O piretróide esfenvalerato não é uma substância prioritária para as águas superficiais da União Europeia, não existindo nenhuma norma de qualidade ambiental. No entanto, vários estudos demonstraram que os piretróides são altamente tóxicos no meio aquático, ao ponto de alterarem o comportamento das espécies piscícolas em concentrações de apenas 1 µg/L (Palmquist et al., 2012). Assim, escolheu-se a concentração de 1,2 µg/L e a concentração de 2 µg/L, para avaliar os efeitos com o dobro da concentração de 1 µg/L.

Os cipriniformes são a maior ordem de peixes de água doce, que inclui uma grande diversidade de espécies (Stout et al., 2016). Na impossibilidade de capturar indivíduos da espécie-alvo em meio fluvial, devido ao elevado caudal que os rios ainda apresentavam em abril, optou-se, para o efeito de seleção das concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato a utilizar nos ensaios posteriores, pela utilização de uma outra espécie exótica da mesma ordem (cipriniformes) muito utilizada como indicador biológico da ecotoxicidade em ambientes aquáticos (Ahmad et al., 2015) e facilmente adquirível, a carpa-comum (*Cyprinus carpio*).

As carpas (n= 14, comprimento médio: 9,5 cm; variação: 8-11 cm de comprimento total) foram adquiridas numa aquariofilia certificada (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 de diâmetro 7,5 cm), onde permaneceram durante um período de 48 horas (Figura 2.2). Os peixes foram alimentados com flocos (Nutrafin ©) até 24 horas antes do início dos pré-ensaios.



**Figura 2.2.** Carpas no tanque de aclimação (tanque de 1100 L; Filtro Canister FX5 de alto desempenho, Fluval, Quebec, Canadá), durante 48 horas.

Após o período de aclimação de 48 horas, deu-se início aos pré-ensaios. As carpas foram agrupadas em 4 grupos de 3 e foram distribuídas por 4 pequenos tanques de 50 L, contendo pedras (seixos-rolados com diâmetros 4-7,5 cm) como substrato, e protegidas com uma rede mosquiteira, de modo a minimizar o *stress*, durante 2 horas. Escolheu-se o período de exposição de 2 horas como valor médio entre o período de 4 horas (em Renick et al., 2015 e em Connon et al., 2009) e o de 1 hora (em Barry et al., 1995), sendo ambos períodos de tempo a partir dos quais já se observaram efeitos do esfenvalerato em peixes. Por outro lado, o período de 2 horas reflete também, aproximadamente, o tempo de exposição aos pesticidas a que os peixes normalmente estão sujeitos, após um evento de precipitação moderada.

Após esse tempo, foram verificados 5 indicadores RAMP (*Reflex Action Mortality Predictors*):

- a) Agarrar a cauda: parâmetro avaliado agarrando a cauda do peixe fora de água. O peixe é considerado alterado/comprometido se não se tentar libertar.
- b) Equilíbrio: parâmetro avaliado virando o peixe ao contrário dentro de água. O peixe terá perdido o equilíbrio se não conseguir retomar o equilíbrio em 3 segundos.
- c) Flexão corporal: parâmetro avaliado segurando o peixe pelo meio do corpo fora de água. O peixe é considerado alterado/comprometido se não se tentar libertar.
- d) Complexo da cabeça: parâmetro avaliado segurando o peixe fora de água e verificando os seus movimentos operculares. O peixe é considerado alterado/comprometido se os movimentos operculares não forem regulares.

- e) Resposta ocular: parâmetro avaliado movimentando o peixe para os dois lados e acompanhado o movimento dos olhos. O peixe é considerado alterado/comprometido se não acompanhar o movimento dos olhos.

Esta metodologia foi originalmente desenvolvida para avaliar o *stress* e a mortalidade dos peixes (Davis, 2010). A cada parâmetro verificado em cada exemplar atribuiu-se a pontuação de 1 ou 0, consoante a existência ou não de alteração do comportamento, respetivamente. Como se verificou que apenas 3 exemplares de carpa evidenciaram alterações no comportamento de flexão corporal para as concentrações de 1,2 e 2,0 µg/L (Tabela 3.1), estas foram as concentrações escolhidas para os ensaios com os exemplares de alburno.

## **2.4 Ensaios**

### **2.4.1 Captura e transporte dos peixes**

Os exemplares de alburno foram capturados no dia 28 de maio de 2021, na ribeira de Sor, num troço fluvial próximo da localidade de Ponte de Sor, tendo-se conseguido uma amostra de 36 peixes, sempre de acordo com o protocolo adotado pelo Comité Europeu de Normalização (CEN, 2003). Escolheu-se um troço representativo do sistema, no qual a equipa, constituída por duas pessoas, se deslocou de jusante para montante em *zig-zag*, de modo a percorrer todos os habitats presentes. Para a captura, recorreu-se ao método de pesca elétrica de corrente contínua (aparelho de pesca elétrica - Hans Grassl IG-200) (Figura 2.3), que se baseia na criação de um campo elétrico na massa de água e que, provocando alterações no comportamento dos peixes, permite a sua captura. É um processo bastante eficiente para baixas profundidades (< 0,8m) e relativamente inofensivo para a fauna piscícola (Barbour et al., 1999).



**Figura 2.3.** Captura de peixes, recorrendo ao método de pesca elétrica (Hans Grassl IG-200).

Após a captura, os peixes foram mantidos numa nassa dentro do rio, fora da influência da eletricidade, para serem mantidos em condições de corrente e oxigenação natural. De seguida, foram medidos ao milímetro mais próximo com um ictiómetro e foram transportados para o campus do ISA em contentores de transporte de peixes (Hans Grassl, 190 L) com um aparelho de aeração portátil (ELITE, Alemanha), para minimizar o *stress* do transporte.

#### **2.4.2 Preparação do mesocosmos**

Os efeitos dos pesticidas na atividade comportamental dos peixes foram testados no sistema de mesocosmos (Figura 2.4) localizado no Campus do ISA. O sistema de mesocosmos utilizado consiste num conjunto de 6 canais artificiais externos de zinco (cada um com 0,4 m de largura x 4 m de comprimento x 0,2 m de profundidade).



**Figura 2.4.** Sistema de mesocosmos do ISA, constituído por 6 canais artificiais externos de zinco.

A água provém de uma nascente natural *in situ* considerada de boa qualidade (Temperatura: 19,1 °C; pH = 8,06; Condutividade = 865  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; Oxigénio dissolvido (OD) = 9 mg/L). A água é armazenada num tanque de 3000 L e, posteriormente, distribuída para os tanques de 70 L, localizados na seção superior de cada canal. Cada canal, delimitado a jusante por um painel de malha fixa, segue para um tanque a jusante (70 L) conectado a uma bomba (Kripsol OK-71 B, 0,56 kW) que opera num sistema de fluxo de recirculação para o tanque de montante. Este sistema de recirculação torna cada canal independente. A distribuição e a recirculação da água foram asseguradas por um sistema de tubos de polietileno de alta densidade (PEAD).

### **2.4.3 Delineamento experimental**

No campus do ISA, os peixes foram mantidos por um período de 48 horas num tanque de aclimação filtrado e arejado (tanques de 1000 L com 800 L de água; Filtro Canister FX5 de alto desempenho, Fluval, Quebec, Canadá) (Figura 2.5), onde foram colocados tubos de PVC (45 cm x 25 cm x 10 cm) para os peixes utilizarem como abrigo e para diminuir eventuais sinais de *stress* (Stammler & Corkum, 2005). Durante este período, os peixes foram alimentados até 24 horas antes do início dos ensaios (flocos Tetrapond). A qualidade da água

nos tanques de aclimação (temperatura, pH e condutividade elétrica) foi verificada todos os dias através de uma sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812-5).



**Figura 2.5.** Tanque de aclimação, no qual os peixes permaneceram durante 48 horas antes dos ensaios.

Após a aclimação, os peixes (3 conjuntos de 4 peixes) foram expostos, durante o período de exposição previamente definido (2 horas) e sob fotoperíodo natural, às três concentrações escolhidas de esfenvalerato – 0,0  $\mu\text{g/L}$  (controle, sem esfenvalerato); 1,2  $\mu\text{g/L}$  (concentração baixa) e 2,0  $\mu\text{g/L}$  (concentração alta) – em três pequenos tanques (Figura 2.6) com 50 L de água e com pedras, para fornecer abrigo, tendo sido cobertos com redes mosquiteiras, não só para minimizar o *stress*, mas também para evitar que os peixes saltassem para fora. Verificou-se a qualidade da água (temperatura, pH e condutividade) dos tanques, através de uma sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812-5).



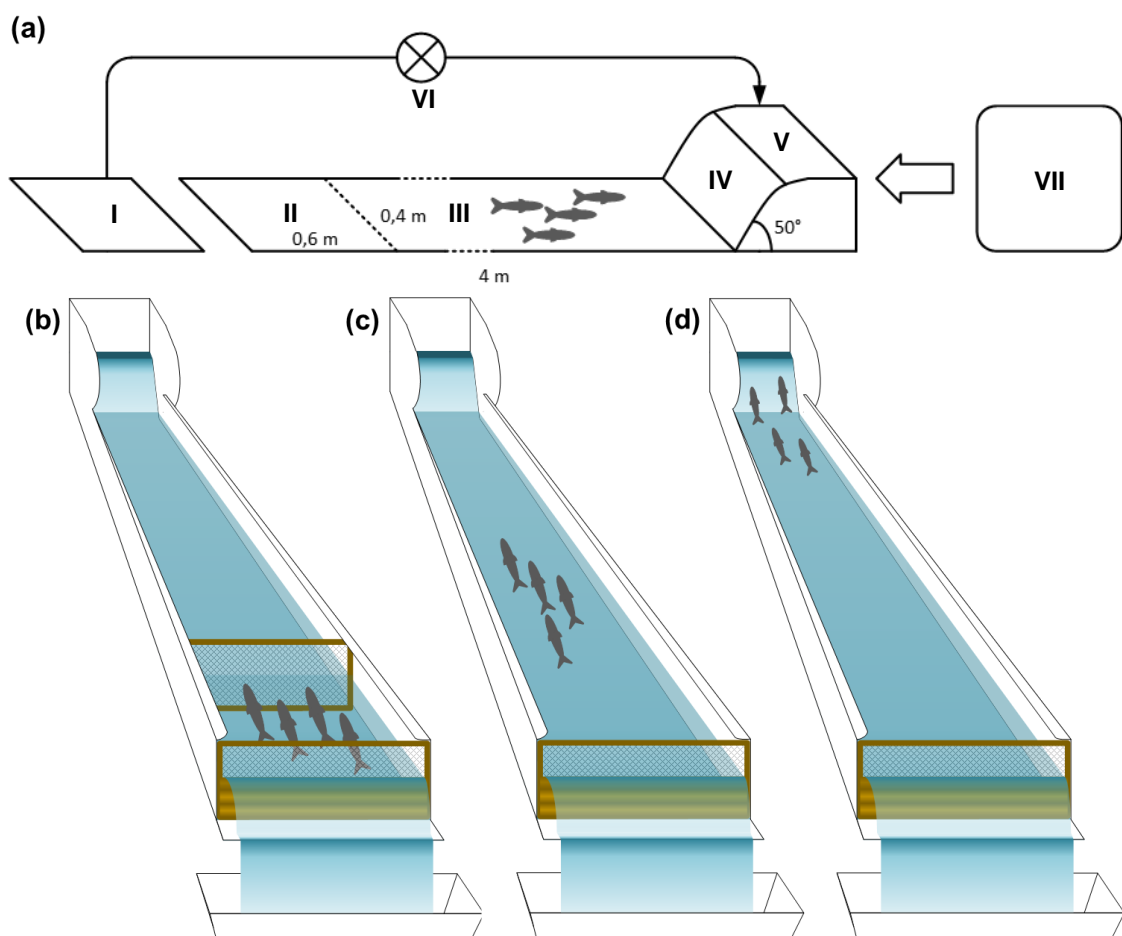
**Figura 2.6.** Tanques de 50 L, onde os peixes foram expostos, durante 2 horas, às três concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato.

Os peixes foram posteriormente transferidos para 3 canais do mesocosmos, contendo a água da nascente do ISA a correr em regime fechado (Figura 2.7 a)), com o objetivo de determinar os parâmetros comportamentais resultantes da prévia exposição ao esfenvalerato (controlo, concentração baixa e concentração alta). Foi previamente feito um período de aclimação às condições do mesocosmos, durante 10 minutos (Figura 2.7 b)), tendo os peixes sido confinados à secção mais a jusante, por intermédio de uma rede. Após esse período, a rede foi removida para permitir o acesso livre dos peixes a todo o canal (Figura 2.7 c)). Cada um dos três tratamentos experimentais foi repetido 3 vezes, dando um total de 9 ensaios (3 concentrações x 3 réplicas). Cada ensaio teve a duração de 60 minutos e consistiu na amostragem instantânea, a cada 3 minutos, dos parâmetros comportamentais de cada um dos 4 peixes:

- 1) Atividade de rotina, classificada como: i) letargia (ou seja, repouso), ii) natação (procura), iii) natação (fuga) ou iv) mudanças direcionais (ou seja, uma alteração de 90° no rumo do peixe) (Brownscombe et al., 2014). É uma característica que está fortemente associada a elevadas taxas de alimentação e crescimento (Mameri et al., 2020; Laubenstein et al., 2018);
- 2) Ousadia, avaliada pela proporção de tentativas de passagem para o tanque localizado a montante (Figura 2.7 d)), num plano superior (Laubenstein et al., 2018). Reflete a maior ou menor predisposição para assumir riscos em ambientes desconhecidos

(Coleman & Wilson, 1998), podendo os peixes alcançar áreas mais favoráveis para refúgio e desova (Mameri et al., 2020; Biro et al., 2003);

- 3) Coesão de cardume, classificada como: 1 (nenhum peixe agregado a uma distância menor do que o comprimento de um peixe); 2 (dois peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe); 3 (três peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe); 4 (todos os peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe) (Manek et al., 2014). Espécies mais gregárias, como o alburno, estão mais protegidas contra predadores, uma vez que, em grupo, os peixes detetam e defendem-se de predadores mais facilmente (Gonino et al., 2019).



**Figura 2.7.** Representação esquemática dos ensaios no sistema de mesocosmos: **a)** canal do mesocosmos (I – tanque a jusante, para onde verte a água; II – zona de aclimação, localizada a jusante do canal (0,6 x 0,4 m); III – canal do mesocosmos, no qual os peixes circulam livremente; IV – rampa; V – tanque a montante (capacidade de 70 L, um para cada canal); VI – bomba ligada ao tanque a jusante, que redireciona a água através de tubos de PEAD (Polietileno de Alta Densidade) de volta ao tanque a montante, permitindo a recirculação do fluxo em regime fechado; VII – tanque central de 3000 L, que fornece água da nascente natural); **b)** aclimação dos peixes na secção a jusante do canal, durante 10 minutos; **c)** movimentação livre dos peixes ao longo do canal, após a remoção da

rede de aclimação; **d**) tentativas de transposição para montante da rampa do canal, que representam a ousadia dos peixes.

O comportamento dos peixes foi continuamente monitorizado visualmente. As observações foram feitas a 0,50 m de distância abaixo de cada canal, com visão total do mesmo, permitindo o registo do comportamento instantâneo dos peixes a cada 3 minutos. Para evitar problemas de pseudo-replicação, no início de cada uma das 3 réplicas, tanto o observador como os canais nos quais os conjuntos de peixes foram testados foram aleatorizados, ou seja, os cardumes foram monitorizados por um observador diferente e nem sempre o mesmo tratamento foi testado no mesmo canal.

Depois de cada ensaio, com o intuito de confirmar a alteração (ou a não alteração) do comportamento dos exemplares de alburno, foram novamente verificados em cada peixe os 5 indicadores RAMP (*Reflex Action Mortality Predictors*) (Davis, 2010). De seguida, os peixes foram medidos com um ictiómetro e pesados numa balança (Figura 2.8). Os parâmetros temperatura, pH e condutividade foram também medidos, com a sonda multiparamétrica (HANNA, HI 9812-5), bem como o oxigénio dissolvido (OD), com a sonda de oxigénio (HI98193, Portugal), e a velocidade da água dos canais, com um molinete (Global Water Instrumentation, Inc., USA, mod. FP-101). (Figura 2.9). Por se tratar de uma espécie exótica, os peixes utilizados nos ensaios não foram devolvidos aos locais de captura.



**Figura 2.8.** Medição do comprimento dos peixes com um ictiómetro (I) e pesagem dos mesmos com uma balança (II).



**Figura 2.9.** Medição da velocidade do fluxo da água dos canais, com o molinete (Global Water Instrumentation, Inc., USA, mod. FP-101).

## **2.5 Análise de dados**

Para verificar se houve diferenças significativas na atividade de rotina, na ousadia e na coesão de cardume dos alburnos durante os ensaios nos canais do mesocosmos, entre as três concentrações (controlo, concentração baixa e concentração alta) do inseticida piretróide esfenvalerato, foram realizados testes de proporção qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Estes foram realizados no software MedCalc (MedCalc Software bvba), no qual se utilizou um nível de significância alfa de 0,05.

### 3. Resultados

#### 3.1 Pré-ensaios

A exposição dos exemplares de carpa (*Cyprinus carpio*) às quatro concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (0,0625; 0,250; 1,2 e 2,0 µg/L), previamente escolhidas para os pré-ensaios, não conduziu, de uma forma geral, a alterações no comportamento dos peixes, ao nível dos indicadores RAMP, conforme se observa na Tabela 3.1. Com efeito, apenas três exemplares evidenciaram alterações ao nível da flexão corporal, um na concentração média (1,2 µg/L) e dois na concentração muito alta (2,0 µg/L).

**Tabela 3.1.** Parâmetros RAMP (*Reflex Action Mortality Predictors*) (Davis, 2010) dos exemplares de carpa, após a exposição prévia de 2 horas ao inseticida piretróide esfenvalerato, classificados como: 0- nenhum peixe alterado e 1- pelo menos um peixe alterado (concentração muito baixa 0,0625 µg/L; concentração baixa 0,250 µg/L; concentração média 1,2 µg/L; e concentração muito alta 2,0 µg/L).

Indicadores	Concentração muito baixa (0,0625 µg/L)	Concentração baixa (0,250 µg/L)	Concentração média (1,2 µg/L)	Concentração muito alta (2,0 µg/L)
Agarrar a cauda	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

\* 1 exemplar de carpa alterado (num máximo de 3) ao nível da flexão corporal, quando exposto à concentração média.

\*\* 2 exemplares de carpa alterados (num máximo de 3) ao nível da flexão corporal, quando expostos à concentração muito alta.

Com base nos resultados obtidos na Tabela 3.1, foram selecionadas para os ensaios experimentais com os exemplares de alburno apenas as concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato que alteraram o comportamento dos indivíduos, nomeadamente as concentrações de 1,2 e 2,0 µg/L, além do controlo, i.e., sem a presença do inseticida.

#### 3.2 Ensaios

Os valores dos parâmetros físico-químicos da qualidade da água dos pequenos tanques de 50 L, medidos após a prévia exposição dos exemplares de alburno às concentrações escolhidas do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2

µg/L; concentração alta 2,0 µg/L) (Tabela 3.2) apresentaram-se bastante semelhantes entre os diferentes tratamentos.

**Tabela 3.2.** Parâmetros físico-químicos da água (Média ± Desvio Padrão) medidos após 2 horas de exposição dos exemplares de alburno a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L).

Parâmetros	Controlo	Concentração baixa (1,2 µg/L)	Concentração alta (2,0 µg/L)
pH	7,93 ± 0,03	7,93 ± 0,03	7,93 ± 0,02
Condutividade (mS/cm)	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,00	0,82 ± 0,02
Temperatura da água (°C)	18,43 ± 0,72	18,43 ± 0,67	18,63 ± 0,85

Os valores dos parâmetros físico-químicos da qualidade da água medidos após a realização dos ensaios experimentais no mesocosmos (Tabela 3.3) também se apresentaram bastante semelhantes entre os diferentes tratamentos.

**Tabela 3.3.** Parâmetros físico-químicos da água e profundidade (Média ± Desvio Padrão) dos canais, após os ensaios experimentais e prévia exposição dos exemplares de alburno a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controlo 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L), cada um com valores de oxigénio dissolvido de 9,02 mg/L, 9,83 mg/L e 9,75 mg/L, respetivamente, e com velocidade da água igual a 0,10 m/s.

Parâmetros	Controlo	Concentração baixa (1,2 µg/L)	Concentração alta (2,0 µg/L)
pH	8,50 ± 0,18	8,49 ± 0,21	8,49 ± 0,23
Condutividade (mS/cm)	0,83 ± 0,01	0,81 ± 0,02	0,83 ± 0,01
Temperatura da água (°C)	20,75 ± 1,00	20,72 ± 1,18	20,68 ± 1,40
Profundidade (cm)	11,8 ± 0,1	11,8 ± 0,3	11,5 ± 0,3

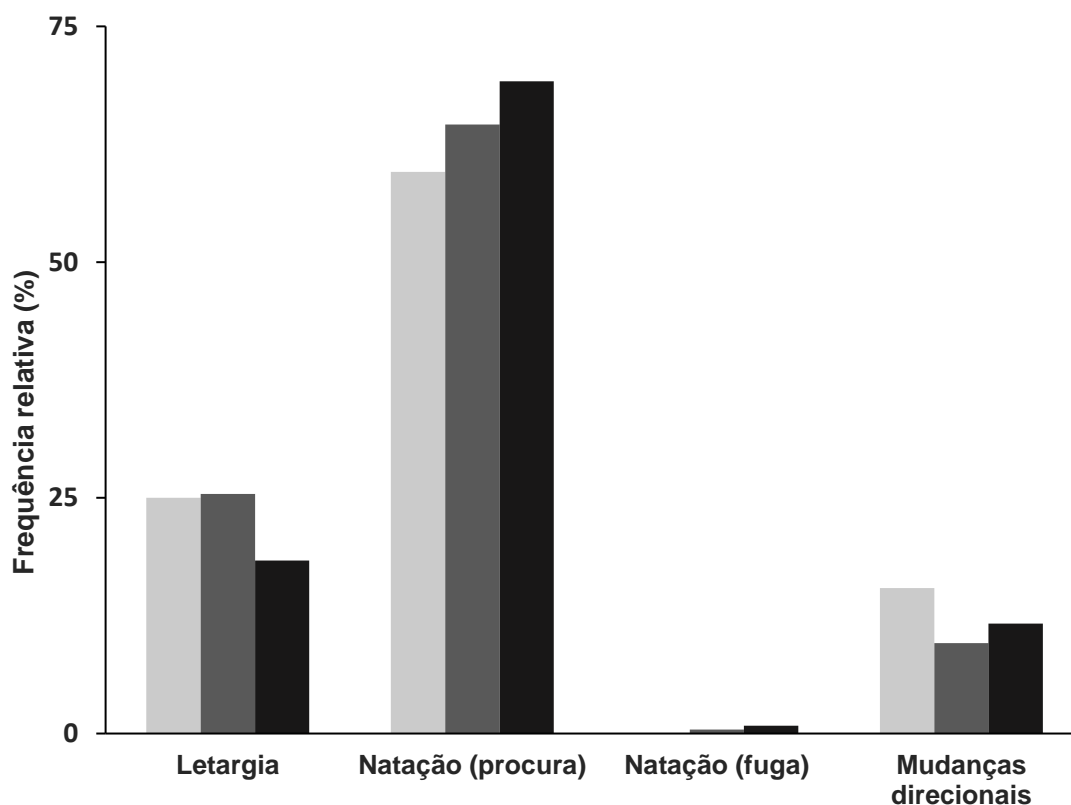
A massa e o comprimento total médio dos exemplares de alburno encontram-se na Tabela 3.4, que revela que os peixes apresentaram parâmetros biométricos muito semelhantes entre os diferentes tratamentos ensaiados.

**Tabela 3.4.** Parâmetros biométricos dos exemplares de alburno (Média ± Desvio Padrão) após os ensaios experimentais e prévia exposição dos peixes a diferentes concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato (controle 0,0 µg/L; concentração baixa 1,2 µg/L; concentração alta 2,0 µg/L).

	Controle	Concentração baixa (1,2 µg/L)	Concentração alta (2,0 µg/L)
Comprimento total (cm)	13,2 ± 1,2	12,6 ± 1,0	12,9 ± 1,3
Massa (g)	15,0 ± 4,0	14,1 ± 3,4	14,6 ± 3,9

### 3.2.1 Atividade de rotina

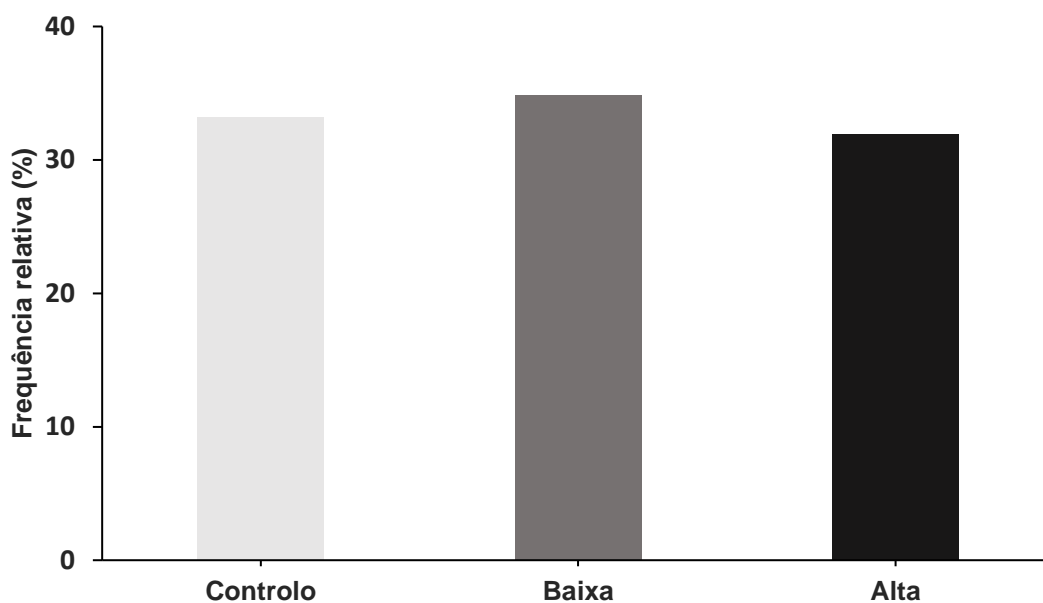
Os resultados mostram que os peixes passaram a maior parte do tempo em natação (procura) (> 60%) (Figura 3.1). Através de testes de proporção  $\chi^2$ , não foram encontradas diferenças significativas no comportamento deste parâmetro entre as diferentes concentrações (controle vs. concentração baixa:  $\chi^2 = 0,592$ ,  $p = 0,441$ ; controle vs. concentração alta:  $\chi^2 = 2,689$ ,  $p = 0,101$ ; concentração baixa vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,570$ ,  $p = 0,450$ ), bem como ao nível do comportamento de letargia (controle vs. concentração baixa:  $\chi^2 = 0,024$ ,  $p = 0,881$ ; controle vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,325$ ,  $p = 0,569$ ; concentração baixa vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,387$ ,  $p = 0,534$ ) e das mudanças direcionais (controle vs. concentração baixa:  $\chi^2 = 0,066$ ,  $p = 0,797$ ; controle vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,005$ ,  $p = 0,943$ ; concentração baixa vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,046$ ,  $p = 0,830$ ). No caso da natação (fuga), não se efetuaram os respectivos testes devido ao número insuficiente de amostras (controle:  $n=0$ ; concentração baixa:  $n=1$ ; concentração alta:  $n=2$ ).



**Figura 3.1.** Frequência relativa (%) dos diferentes tipos de atividade de rotina (letargia, natação (procura), natação (fuga) e mudanças direcionais) executadas pelos alburnos nos canais experimentais do mesocosmos, após exposição prévia (2 horas) a diferentes níveis de concentração do inseticida piretróide esfenvalerato (cinzento claro – controlo 0,0 µg/L; cinzento escuro – concentração baixa 1,2 µg/L; e preto – concentração alta 2,0 µg/L).

### 3.2.2 Ousadia

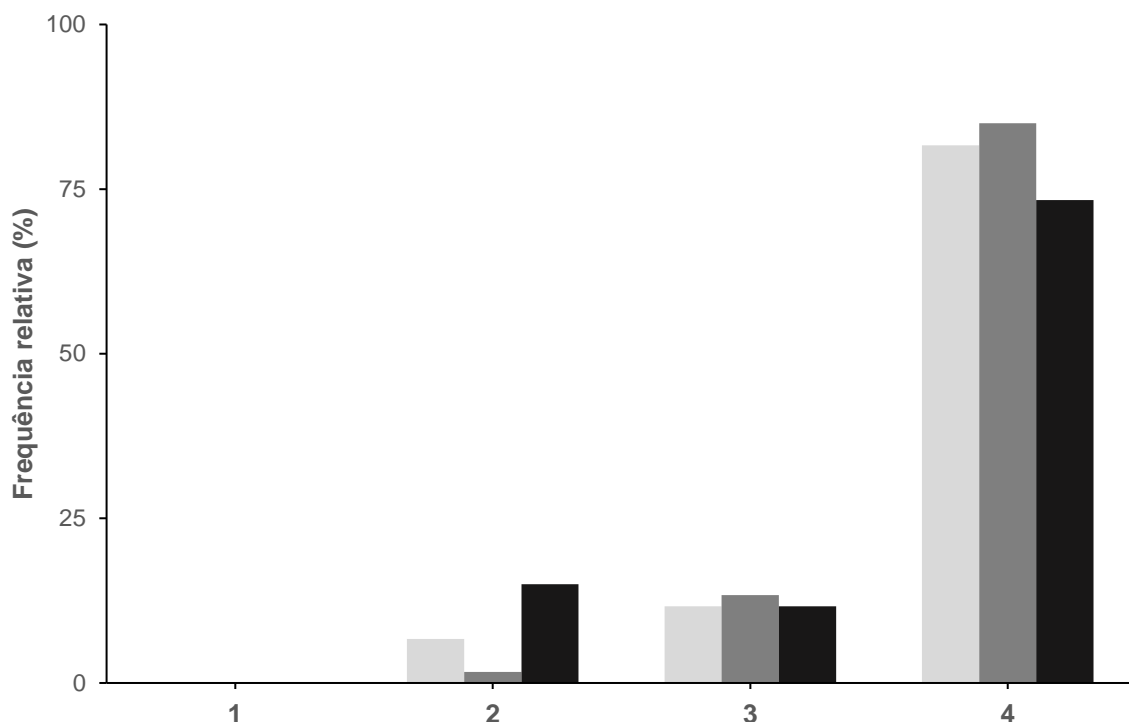
O comportamento de ousadia, quantificado através da proporção de tentativas de transposição da rampa, evidenciou que os peixes tentaram transpor a rampa com maior frequência quando expostos à concentração baixa (1,2 µg/L), seguindo-se o controlo (0,0 µg/L) e a concentração alta (2,0 µg/L), embora as diferenças sejam muito residuais e não significativas. A percentagem de tentativas de transposição da rampa foi de 33,20% (n=80) para o controlo, 34,85% (n=84) para a concentração baixa e 31,95% (n=77) para a concentração alta (Figura 3.2). No entanto estas diferenças não se revelaram estatisticamente significativas (controlo vs. concentração baixa:  $\chi^2 = 0,003$ ,  $p = 0,95$ ; controlo vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,000$ ,  $p = 0,99$ ; concentração baixa vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,049$ ,  $p = 0,82$ ).



**Figura 3.2.** Frequência relativa (%) do número de tentativas de transposição da rampa, localizada a montante dos canais experimentais do mesocosmos, por parte dos exemplares de alburno, após exposição prévia (2 horas) a diferentes níveis de concentração do inseticida piretróide esfenvalerato (cinzento claro – controlo 0,0 µg/L; cinzento escuro – concentração baixa 1,2 µg/L; e preto – concentração alta 2,0 µg/L).

### 3.2.3 Coesão de cardume

Os resultados mostram que, para as três concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato, os peixes passaram a maior parte do tempo em coesão máxima (nível 4) (controlo: n=49, 82%; concentração baixa: n=51, 85%; concentração alta: n=44, 73%), como mostra a Figura 3.3. Através de testes de proporção  $\chi^2$ , não foram encontradas diferenças significativas no nível 4 de coesão de cardume (controlo vs. concentração baixa:  $\chi^2 = 0,03$ , p= 0,85; controlo vs. concentração alta:  $\chi^2 = 0,50$ , p= 0,48; concentração baixa vs. concentração alta:  $\chi^2 = 1,34$ , p= 0,25). Para os restantes níveis de coesão, não foram efetuados os testes estatísticos respetivos devido ao baixo número de amostras (nível 3 – controlo: n=7; concentração baixa: n=8; concentração alta: n=7; nível 2 – controlo: n=4; concentração baixa: n=1; concentração alta: n=9).



**Figura 3.3.** Frequência relativa (%) dos diferentes estados de coesão do cardume (classificada como: 1- nenhum peixe agregado a uma distância menor do que o comprimento de um peixe; 2- dois peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe; 3- três peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe e 4- todos os peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe) dos exemplares de alburno, durante os ensaios experimentais no mesocosmos, após prévia exposição a diferentes concentrações (cinzento claro - controle 0,0 µg/L; cinzento escuro - concentração baixa 1,2 µg/L; e preto - concentração alta 2,0 µg/L) do inseticida piretróide esfenvalerato.

### 3.3 Pós-ensaios

A avaliação dos indicadores RAMP nos exemplares de alburno previamente ensaiados no mesocosmos às três concentrações (0,0; 1,2 e 2,0 µg/L) e após os ensaios, não evidenciou alteração comportamental em qualquer dos referidos indicadores (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5.** Indicadores RAMP (*Reflex Action Mortality Predictors*) (Davis, 2010) dos exemplares de alburno, após a exposição prévia de 2 horas ao inseticida piretróide esfenvalerato, classificados como: 0- não alterado e 1- alterado (Controlo 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; e Concentração alta 2,0 µg/L).

<b>Indicadores</b>	<b>Controlo</b>	<b>Concentração baixa (1,2 µg/L)</b>	<b>Concentração alta (2,0 µg/L)</b>
Agarrar a cauda	0	0	0
Equilíbrio	0	0	0
Flexão corporal	0	0	0
Complexo da cabeça	0	0	0
Resposta ocular	0	0	0

## 4. Discussão

A contaminação dos ecossistemas aquáticos, nomeadamente por pesticidas, tem sofrido um forte crescimento nos últimos anos (Gonçalves et al., 2021; Renick et al., 2015). Os inseticidas correspondem ao maior grupo de pesticidas (Figueiredo, 2014), do qual fazem parte os piretróides. Estes são um dos grupos de inseticidas mais utilizados, pelo que é importante a realização de estudos que avaliem os impactos destes na fauna aquática. Assim, este estudo teve como objetivo a avaliação dos efeitos sub-letais do inseticida piretróide esfenvalerato no comportamento de uma espécie piscícola exótica em Portugal – o alburno (*Alburnus alburnus*). Sendo uma espécie exótica de carácter invasor (Vinyoles et al., 2007), é importante perceber como esta reage às perturbações do meio, neste caso à presença de um pesticida. Para tal, foram avaliadas três métricas comportamentais – a atividade de rotina, a ousadia e a coesão de cardume – tendo os exemplares de alburno sido previamente expostos a três concentrações de esfenvalerato (Controlo 0,0 µg/L; Concentração baixa 1,2 µg/L; Concentração alta 2,0 µg/L) durante 2 horas. Os ensaios foram realizados num sistema de mesocosmos, que permite fazer ensaios experimentais com animais selvagens em condições parcialmente controladas, mas num ambiente semelhante ao ambiente natural, tendo, portanto, um nível de controlo intermédio entre ensaios *in situ* e ensaios puramente laboratoriais (Gonino et al., 2019).

A atividade de rotina dos exemplares de alburno não foi afetada pelo aumento da concentração do esfenvalerato. Apenas na natação (procura) se verificou um ligeiro aumento de atividade com o aumento da concentração, embora não estatisticamente significativo. Estes resultados não estão de acordo com os observados noutros trabalhos. Por exemplo, larvas das espécies *Atherinops affinis* e *Pimephales promelas* demonstraram inibição da capacidade de natação após 4 horas de exposição ao esfenvalerato em concentrações que variaram entre 0,455 e 1,18 µg/L (Renick et al., 2015; Floyd et al., 2008). Com o aumento da concentração do pesticida, os alburnos mantiveram a sua atividade, não tendo sido encontrado um padrão entre os diferentes tratamentos. Este é um resultado importante, pois evidencia que esta espécie exótica, ao manter a sua atividade, mesmo para concentrações relativamente elevadas, como a que foi usada no presente trabalho (2 µg/L), poderá ser tolerante a este tipo de perturbações. Este resultado parece, como tal, demonstrar que esta espécie apresenta alguma forma de tolerância à deterioração da qualidade da água (Benejam et al., 2008), em particular à presença de pesticidas como o esfenvalerato.

A ousadia é uma característica que pode variar de espécie para espécie. Os indivíduos mais tímidos tendem a recuar e a ficar vigilantes para se manterem seguros (Leite et al., 2019). Já os indivíduos ousados tendem a fazer movimentos exploratórios mais longos, sendo maior

a predisposição para assumir riscos em ambientes desconhecidos (Coleman & Wilson, 1998) e potenciando a exposição a predadores, comparativamente a indivíduos mais tímidos. No entanto, a predisposição para explorar novos ambientes pode trazer vantagens, principalmente se no ambiente natural a competição por recursos for elevada. Chapman et al. (2011) mostrou que indivíduos mais ousados têm uma maior propensão para migrar do que indivíduos mais tímidos. Relativamente à ousadia dos exemplares de alburno testados, embora não tenham sido registadas diferenças estatisticamente significativas na proporção de tentativas de transposição desta espécie, após exposição prévia a diferentes concentrações de esfenvalerato, verificou-se um número superior de tentativas de transposição após a exposição à concentração baixa e um menor número após a exposição à concentração alta. Este aumento de ousadia para a concentração baixa, seguido de uma redução para a concentração inicial, embora seja uma diferença residual, poderá querer indicar um efeito do tipo “*subsidy-stress gradient*”. Este efeito permite explicar que baixos níveis de uma perturbação podem induzir um determinado comportamento (neste caso, uma maior ousadia, traduzida numa maior proporção de tentativas de transposição), sendo esse comportamento inibido quando se atinge uma concentração superior a determinado limiar (Odum et al., 1979), tal como o observado em várias espécies piscícolas, após uma alteração no uso do solo, em particular um aumento do *input* de nutrientes e sedimentos nos cursos de água (Braund et al., 2019). Por outro lado, em populações de várias espécies potamódromas, existem indivíduos que têm a capacidade de se comportar, alternadamente, de forma residente e de forma migradora para aumentarem a *fitness* (Branco et al., 2017; Knaepkens et al., 2005). Assim, a ligeira diferença na ousadia entre as três concentrações, embora não significativa, também pode, por hipótese, ser explicada pela potencial existência de indivíduos mais afoitos no canal onde foram testados os peixes expostos à concentração baixa e de indivíduos menos afoitos no canal onde foram testados os peixes expostos à concentração alta, caso esta população de alburnos tenha uma dispersão de comportamentos de ousadia. Futuros trabalhos, empregando um maior número de amostras, poderão confirmar isto.

Assim como para a atividade de rotina e a ousadia, não se observou uma relação entre a coesão de cardume e a exposição prévia a um aumento da concentração de esfenvalerato. A coesão de cardume é classificada como o número de peixes agregados a uma distância menor do que o comprimento de um peixe (Manek et al., 2014). Floyd et al., (2008) mostrou que os peixes da espécie *Pimephales promelas* aumentaram a distância entre os peixes do cardume depois de 4 horas expostos a 0,455 e 1,142 µg/L de esfenvalerato. No entanto, os resultados do presente estudo são coerentes com o facto de o alburno ser uma espécie gregária (da Silva et al., 2019), ou seja, os indivíduos passaram a maior parte do tempo em coesão máxima (nível 4). Mais uma vez, e em conformidade com os resultados obtidos para

a atividade de rotina, a capacidade gregária da espécie parece não ter sofrido alterações após a exposição prévia a um gradiente crescente de concentração do pesticida. A tendência de não alteração de comportamento do alburno após exposição ao esfenvalerato, demonstrada pela falta de diferenças significativas para as 3 métricas comportamentais testadas, é corroborada pelo facto de nenhum peixe ter mostrado também qualquer afetação aquando da verificação dos indicadores RAMP.

As alterações climáticas têm vindo a revelar-se um grande problema ambiental (Dai, 2011), sendo de esperar um aumento da extensão de períodos de seca e de ondas de calor (Mameri et al., 2020), que impactarão certamente as espécies nativas aquáticas, nomeadamente os peixes (Costa et al., 2021). Em sistemas lóticos, como rios e ribeiras, a dessecação natural de muitos cursos de água, acelerada futuramente pelas alterações climáticas, aumentará o tempo de residência dos pesticidas e, por sua vez, a respetiva concentração no sistema (Let et al., 2021). Deste modo, e de acordo com os resultados obtidos, o facto de até mesmo concentrações elevadas, como as usadas no presente trabalho, não terem provocado alterações comportamentais no alburno, pode efetivamente conferir-lhes vantagens competitivas nestes meios lóticos, em relação às espécies nativas. Da mesma forma, estas espécies terão igualmente vantagem acrescida em meios lênticos artificiais (p.e., albufeiras), onde naturalmente já têm vantagens em relação a espécies nativas da Península Ibérica – agora acrescida pelo facto de tolerarem elevadas concentrações do pesticida esfenvalerato, suscetível de ser lixiviado para estas massas de água. Assim, é necessário um maior controlo nas introduções de espécies exóticas, assim como ações de conservação e recuperação de ecossistemas ribeirinhos, uma maior frequência de monitorização dos mesmos, programas de consciencialização pública sobre as ameaças das espécies introduzidas nos ecossistemas, bem como uma regulamentação mais forte sobre a aplicação de pesticidas na agricultura (Holdway et al., 1994), principalmente no que diz respeito a concentrações e frequência de aplicação.

Uma vez que são muito raros os meios naturais afetados apenas por um contaminante (Verma et al., 1980), é importante que futuros estudos incluam a avaliação de efeitos cumulativos com outros contaminantes (p.e., herbicidas, fungicidas) que muitas vezes interagem nos sistemas dulçaquícolas. Para além de misturas de pesticidas nas águas superficiais, estão presentes nos ecossistemas aquáticos muitos outros contaminantes, como metais pesados e poluentes orgânicos persistentes (POPs) (Lydy et al., 2004). Vários estudos indicam que a toxicidade de várias combinações de pesticidas é aditiva (o efeito final da combinação é igual à soma dos efeitos individuais dos dois agentes tóxicos). No entanto, algumas misturas de pesticidas, principalmente de inseticidas, revelaram-se sinérgicas, com aumentos na toxicidade de até 100 vezes (Denton et al., 2003; Thompson, 1996). Para

além disso, a pré-exposição ou até mesmo a exposição simultânea a outros contaminantes ou outras condições ambientais pode levar a alterações fisiológicas e, por sua vez, aumentar a suscetibilidade dos organismos. Por exemplo, misturas de piretróide esfenvalerato e organofosfatos clorpirifos revelaram uma toxicidade superior à aditiva em *Pimephales promelas* (Belden & Lydy, 2006), assim como misturas entre piretróides e carbamatos. Para além de parâmetros comportamentais, os testes de toxicidade sub-letal podem ser realizados avaliando parâmetros hematológicos e imunológicos, estruturais e funcionais, energéticos e neurológicos (Werner & Moran, 2008). A manutenção de galerias ribeirinhas nativas bem estruturadas, bem como o estímulo ao seu restauro quando degradadas, pode futuramente constituir uma medida eficaz de gestão que permitirá certamente reduzir, pela filtração, os impactos provenientes do aumento destas substâncias nos ecossistemas ribeirinhos (Aguar et al., 2015).

## 5. Conclusão

Os resultados deste trabalho mostraram que a atividade comportamental de uma espécie piscícola exótica invasora em Portugal, o alburno – avaliada através da atividade de rotina, da ousadia e da coesão de cardume – não foi significativamente afetada pelo aumento da concentração do inseticida piretróide esfenvalerato. A importância destes parâmetros comportamentais reflete-se ao nível do desempenho individual e coletivo dos peixes, nomeadamente nas consequências que acarreta para atividades como a procura de locais para alimentação, reprodução, refúgio e proteção contra predadores (Mameri et al., 2020).

As concentrações do inseticida piretróide esfenvalerato testadas foram bastante elevadas, tendo sido já testadas noutras espécies (nativas) com efeitos marcados ao nível comportamental, embora não em cipriniformes leuciscídeos. O facto de não se ter verificado qualquer diferença nos diferentes parâmetros comportamentais do alburno (que é uma espécie exótica invasora em Portugal) entre a situação de controlo (ausência do esfenvalerato) e após prévia exposição à concentração alta deste pesticida, é preocupante, uma vez que lhe pode conferir uma vantagem competitiva relativamente às espécies nativas que com ele competem diretamente, nomeadamente os pequenos ciprinídeos do género *Squalius* e *Anaecypris* (Collares-Pereira et al., 2021). As alterações climáticas podem exacerbar esta possível vantagem competitiva, uma vez que o efeito de diluição natural dos pesticidas nos rios será menor. O aumento dos períodos de seca pode levar ainda a uma maior fragmentação sazonal dos sistemas, aumentando o tempo de residência destes produtos químicos e, concomitantemente, o tempo a que os peixes lhe estão expostos.

Apesar de este estudo se ter focado em exemplares de alburno adultos, é igualmente importante realizar estudos em peixes noutros estágios de vida, como larvas e juvenis, que estarão à partida mais vulneráveis aos efeitos de pesticidas (Courrat et al., 2009; Beck et al., 2003), bem como em outros organismos de água doce. Para além disso, é importante investigar o efeito aditivo ou sinérgico de múltiplas pressões (p.e., o efeito isolado e combinado de diferentes pesticidas), para se perceber como a interação das mesmas pode impactar a atividade comportamental dos peixes. O efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição deve também ser estudado de modo a ter um conhecimento mais completo do efeito deste tipo de poluentes na fauna aquática. O facto de a exposição às concentrações escolhidas de esfenvalerato não ter afetado o comportamento do alburno reforça a necessidade de compreensão da tolerância das espécies exóticas a este tipo de perturbações, e da criação de medidas que restrinjam a aplicação de pesticidas, que lhes podem dar vantagens competitivas, e que controlem a invasão de espécies exóticas.

## Referências bibliográficas

Aguiar, T. R., Bortolozo, F. R., Hansel, F. A., Rasera, K., & Ferreira, M. T. (2015). Riparian buffer zones as pesticide filters of no-till crops. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10618-10626.

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*, 2015, 7p.

Allan, D., Erickson, D., & Fay, J. (1997). The influence of catchment land use on stream integrity across multiple spatial scales. *Freshwater Biology*, 37(1), 149-161.

Almeida, D., & Grossman, G. D. (2012). Utility of direct observational methods for assessing competitive interactions between non-native and native freshwater fishes. *Fisheries Management and Ecology*, 19(2), 157-166.

Almeida, D., Stefanoudis, P. V., Fletcher, D. H., Rangel, C., & da Silva, E. (2014). Population traits of invasive bleak *Alburnus alburnus* between different habitats in Iberian fresh waters. *Limnologica*, 46, 70-76.

Anastácio, P. M., Ribeiro, F., Capinha, C., Banha, F., Gama, M., Filipe, A. F., Rebelo, R., & Sousa, R. (2019). Non-native freshwater fauna in Portugal: A review. *Science of the Total Environment*, 650, 1923-1934.

Baldwin, D. H., Spromberg, J. A., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2009). A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations. *Ecological Applications*, 19(8), 2004-2015.

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. Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.

Barry, M. J., Logan, D. C., Van Dam, R. A., Ahokas, J. T., & Holdway, D. A. (1995). Effect of age and weight-specific respiration rate on toxicity of esfenvalerate pulse-exposure to the Australian crimson-spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 32(2-3), 115-126.

Beck, M. W., Heck, K. L., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., Halpem, B. S., Hays, C. G., Hoshino, K., Minello, T. J., Orth, R. J., Sheridan, P. F., & Weinstein, M. P. (2003). The role of nearshore ecosystems as fish and shellfish nurseries. *Issues in Ecology*, 11, 1-12.

Belden, J. B., & Lydy, M. J. (2006). Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(2), 623-629.

Benejam, L., Benito, J., Ordóñez, J., Armengol, J., & García-Berthou, E. (2008). Short-term effects of a partial drawdown on fish condition in a eutrophic reservoir. *Water, Air, and Soil Pollution*, 190(1), 3-11.

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.

Branco P (2013). Improving connectivity for river fish. PhD Thesis, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal.

Branco, P., Amaral, S. D., Ferreira, M. T., & Santos, J. M. (2017). Do small barriers affect the movement of freshwater fish by increasing residency?. *Science of the Total Environment*, 581, 486-494.

Braund, D., Feltmann, A., Gavrielides, G., Lang, K., Main, J., Mogilevski, A., Mosbey, J., Relic, R., Rezac, C., Trejo, B., Adams, G., & Adams, S. R. (2019). A Tale of Two Sylamores: Understanding Relationships Among Land Use, Nutrients, and Aquatic Communities Across a Subsidy-Stress Gradient. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 73(1), 93-105.

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.

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.

Cavaco, M., & Henriques, M. (2013). Guia dos produtos fitofarmacêuticos lista dos produtos com venda autorizada. Lisboa: Direção-Geral de Alimentação e Veterinária.

Chapman, B. B., Hulthén, K., Blomqvist, D. R., Hansson, L. A., Nilsson, J. Å., Brodersen, J., Nilsson, P. A., Skov, C., & Brönmark, C. (2011). To boldly go: individual differences in boldness influence migratory tendency. *Ecology Letters*, *14*(9), 871-876.

Choudhury, N. (2018). Ecotoxicology of aquatic system: a review on fungicide induced toxicity in fishes. *Pro Aqua Farm Marine Biol*, *1*(1), 180001.

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., Almeida, P. R., da Costa, L., Gante, H., Filipe, A. F., Aboim, M. A., Rodrigues, P. M., & Magalhães, M. F. (2021). Guia dos Peixes de Água Doce e Migradores de Portugal Continental. *Edições Afrontamento, Porto*. 292 pp. ISBN:978-972-36-1849-5.

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), 1-18.

Corcellas, C., Feo, M. L., Torres, J. P., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment International*, *47*, 17-22.

Costa, M. J., Duarte, G., Segurado, P., & Branco, P. (2021). Major threats to European freshwater fish species. *Science of the Total Environment*, *797*, 149105.

Courrat, A., Lobry, J., Nicolas, D., Laffargue, P., Amara, R., Lepage, M., Girardin, M., & Le Pape, O. (2009). Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *81*(2), 179-190.

Crawley, M. J. (1986). The population biology of invaders. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *314*(1167), 711-731.

Cuevas, N., Martins, M., & Costa, P. M. (2018). Risk assessment of pesticides in estuaries: a review addressing the persistence of an old problem in complex environments. *Ecotoxicology*, *27*(7), 1008-1018.

da Silva, J., Matono, P., Barata, E., Bernardo, J. M., Costa, A. M., & Ilhéu, M. (2019). Behavioural interactions between the endangered native fish Saramugo, *Anaecypris hispanica*, and the invasive Bleak, *Alburnus alburnus*. *Limnetica*, 38(2), 517-533.

Dai, A. (2011). Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2(1), 45-65.

Dang, Z. (2016). Interpretation of fish biomarker data for identification, classification, risk assessment and testing of endocrine disrupting chemicals. *Environment International*, 92, 422-441.

Davis, M. W. (2010). Fish stress and mortality can be predicted using reflex impairment. *Fish and Fisheries*, 11(1), 1-11.

Deanovic, L. A., Markiewicz, D., Stillway, M., Fong, S., & Werner, I. (2013). Comparing the effectiveness of chronic water column tests with the crustaceans *Hyalella azteca* (order: Amphipoda) and *Ceriodaphnia dubia* (order: Cladocera) in detecting toxicity of current-use insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(3), 707-712.

Denton, D. L., Wheelock, C. E., Murray, S. A., Deanovic, L. A., Hammock, B. D., & Hinton, D. E. (2003). Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(2), 336-341.

Dudgeon, D. (2019). Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology*, 29(19), R960-R967.

Elvira, B., & Almodóvar, A. (2009). Threatened fishes of the world: *Parachondrostoma turiense* (Elvira, 1987)(Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes*, 86(2), 337-338.

Epstein, L., Bassein, S., & Zalom, F. (2000). Almond and stone fruit growers reduce OP, increase pyrethroid use in dormant sprays. *California Agriculture*, 54(6), 14-19.

Ferreira, T., Oliveira, J., Caiola, N., Sostoa, A. C. F., Cortes, R., Economou, A., & Zogaris, S., Garcia-Jalon D., Ilhéu M., Martinez-Capel F., Pont D., Rogers C., Prenda J. (2007). Ecological traits of fish assemblages from Mediterranean Europe and their responses to human disturbance. *Fisheries Management and Ecology*, 14(6), 473-481.

Figueiredo, A. C. P. (2014). *Piretróides: Uma nova geração de insecticidas*. Master's thesis, Universidade Lusófona, Lisboa.

Finnegan, M. C., Emburey, S., Hommen, U., Baxter, L. R., Hoekstra, P. F., Hanson, M. L., Thompson, H., & Hamer, M. (2018). A freshwater mesocosm study into the effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam at multiple trophic levels. *Environmental Pollution*, 242, 1444-1457.

Fleeger, J. W., Carman, K. R., & Nisbet, R. M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 317(1-3), 207-233.

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.

Godinho, F. N. (2006). Peixes fluviais exóticos em Portugal Continental: mediação ambiental das introduções de sucesso. *Actas do 1º Simpósio sobre Espécies Exóticas: Introdução, Causas e Consequências*, 7-23.

Gonçalves, A. M., Rocha, C. P., Marques, J. C., & Gonçalves, F. J. (2021). Enzymes as useful biomarkers to assess the response of freshwater communities to pesticide exposure—A review. *Ecological Indicators*, 122, 107303.

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.

Green, P. A., Vörösmarty, C. J., Harrison, I., Farrell, T., Sáenz, L., & Fekete, B. M. (2015). Freshwater ecosystem services supporting humans: Pivoting from water crisis to water solutions. *Global Environmental Change*, 34, 108-118.

Hatakeyama, S., Shiraishi, H., & Kobayashi, N. (1990). Effects of aerial spraying of insecticides on nontarget macrobenthos in a mountain stream. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19(3), 254-270.

Heckmann, L. H., & Friberg, N. (2005). Macroinvertebrate community response to pulse exposure with the insecticide lambda-cyhalothrin using in-stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(3), 582-590.

Helgen, J. C., Larson, N. J., & Anderson, R. L. (1988). Responses of zooplankton and Chaoborus to temephos in a natural pond and in the laboratory. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(4), 459-471.

Holdway, D. A., Barry, M. J., Logan, D. C., Robertson, D., Young, V., & Ahokas, J. T. (1994). Toxicity of pulse-exposed fenvalerate and esfenvalerate to larval Australian crimson-spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 28(3-4), 169-187.

Knaepkens, G., Baekelandt, K., & Eens, M. (2005). Assessment of the movement behaviour of the bullhead (*Cottus gobio*), an endangered European freshwater fish. *Animal Biology*, 55(3), 219-226.

Lao, W., Tiefenthaler, L., Greenstein, D. J., Maruya, K. A., Bay, S. M., Ritter, K., & Schiff, K. (2012). Pyrethroids in Southern California coastal sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(7), 1649-1656.

Laubenstein, T. D., Rummer, J. L., Nicol, S., Parsons, D. M., Pether, S. M., Pope, S., Smith, N., & Munday, P. L. (2018). Correlated effects of ocean acidification and warming on behavioral and metabolic traits of a large pelagic fish. *Diversity*, 10(2), 35.

Leite, T. (2018). *Does salinization of freshwater alter fish behaviour?*. Master's dissertation, Universidade de Coimbra.

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.

Let, M., Špaček, J., Ferenčík, M., Kouba, A., & Bláha, M. (2021). Insecticides and Drought as a Fatal Combination for a Stream Macroinvertebrate Assemblage in a Catchment Area Exploited by Large-Scale Agriculture. *Water*, 13(10), 1352.

Liang, Y. J., Wang, H. P., Long, D. X., Li, W., & Wu, Y. J. (2013). A metabonomic investigation of the effects of 60 days exposure of rats to two types of pyrethroid insecticides. *Chemico-biological Interactions*, 206(2), 302-308.

Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI Journal*, 17, 1101.

Lydy, M., Belden, J., Wheelock, C., Hammock, B., & Denton, D. (2004). Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecology and Society*, 9(6).

Maceda-Veiga, A., & de Sostoa, A. (2011). Observational evidence of the sensitivity of some fish species to environmental stressors in Mediterranean rivers. *Ecological Indicators*, 11(2), 311-317.

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., 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, 90-97.

McGourty, C. R., Hobbs, J. A., Bennett, W. A., Green, P. G., Hwang, H. M., Ikemiyagi, N., Lewis, L., & Cope, J. M. (2009). Likely population-level effects of contaminants on a resident estuarine fish species: comparing *Gillichthys mirabilis* population static measurements and vital rates in San Francisco and Tomales Bays. *Estuaries and Coasts*, 32(6), 1111-1120.

Meite, F., Alvarez-Zaldivar, P., Crochet, A., Wiegert, C., Payraudeau, S., & Imfeld, G. (2018). Impact of rainfall patterns and frequency on the export of pesticides and heavy-metals from agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 616, 500-509.

Mensah, P. K., Palmer, C. G., & Muller, W. J. (2014). Lethal and sublethal effects of pesticides on aquatic organisms: The case of a freshwater shrimp exposure to roundup®. *Pesticides: Toxic Aspects, InTech Publications, Rijeka, Croatia*, 163-185.

Miao, J., Wang, D., Yan, J., Wang, Y., Teng, M., Zhou, Z., & Zhu, W. (2017). Comparison of subacute effects of two types of pyrethroid insecticides using metabolomics methods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 161-167.

Milardi, M., Aschonitis, V., Gavioli, A., Lanzoni, M., Fano, E. A., & Castaldelli, G. (2018). Run to the hills: exotic fish invasions and water quality degradation drive native fish to higher altitudes. *Science of the Total Environment*, 624, 1325-1335.

Moyle, P. B., & Light, T. (1996). Fish invasions in California: do abiotic factors determine success?. *Ecology*, 77(6), 1666-1670.

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

Oros, D. R., & Werner, I. (2005). *Pyrethroid insecticides: an analysis of use patterns, distributions, potential toxicity and fate in the Sacramento-San Joaquin Delta and Central Valley*. Oakland, EUA: San Francisco Estuary Institute.

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

Polat, F., Akın, Ş., Yıldırım, A., & Dal, T. (2016). The effects of point pollutants-originated heavy metals (lead, copper, iron, and cadmium) on fish living in Yeşilırmak River, Turkey. *Toxicology and Industrial Health*, 32(8), 1438-1449.

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.

Ribeiro, F., & Leunda, P. M. (2012). Non-native fish impacts on Mediterranean freshwater ecosystems: current knowledge and research needs. *Fisheries Management and Ecology*, 19(2), 142-156.

Rimet, F., & Bouchez, A. (2011). Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators*, 11(2), 489-499.

Santana, M. S., Sandrini-Neto, L., Di Domenico, M., & Prodocimo, M. M. (2021). Pesticide effects on fish cholinesterase variability and mean activity: A meta-analytic review. *Science of The Total Environment*, 757, 143829.

Schäfer, R. B., van den Brink, P. J., & Liess, M. (2011). Impacts of pesticides on freshwater ecosystems. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 2011, 111-137.

Scott, G. R., & Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369-392.

Segurado, P., Santos, J. M., Pont, D., Melcher, A. H., Jalon, D. G., Hughes, R. M., & Ferreira, M. T. (2011). Estimating species tolerance to human perturbation: Expert judgment versus empirical approaches. *Ecological Indicators*, 11(6), 1623-1635.

Stammler, K. L., & Corkum, L. D. (2005). Assessment of fish size on shelter choice and intraspecific interactions by round gobies *Neogobius melanostomus*. *Environmental Biology of Fishes*, 73(2), 117-123.

Stout, C. C., Tan, M., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., & Armbruster, J. W. (2016). Resolving Cypriniformes relationships using an anchored enrichment approach. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 1-13.

Swank, A., Wang, L., Ward, J., & Schoenfuss, H. (2021). Multigenerational effects of a complex urban contaminant mixture on the behavior of larval and adult fish in multiple fitness contexts. *Science of the Total Environment*, 791, 148095.

Thompson, H. M. (1996). Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology*, 5(2), 59-81.

Verma, S. R., Rani, S., Bansal, S. K., & Dalela, R. C. (1980). Effects of the pesticides thiothox, dichlorvos and carbofuran on the test fish *Mystus vittatus*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 13(2), 229-234.

Vieira, C. E. D., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). The pyrethroid  $\lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 210, 958-967.

Vinyoles, D., Robalo, J. I., Sostoa, A. D., Almodóvar, A. M., Elvira, B., Nicola, G. G., Fernández-Delgado, C., Santos, C. S., Doadrio, I., Sardá-Palomera, F., & Almada, V. C. (2007). Spread of the alien bleak *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) (Actinopterygii cyprinidae) in the Iberian Peninsula: the role of reservoirs. *Graellsia*, 63(1), 101-110.

Weis, J. S., & Candelmo, A. (2012). Pollutants and fish predator/prey behavior: a review of laboratory and field approaches. *Current Zoology*, 58(1), 9-20.

Werner, I., & Moran, K. (2008). Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms. *Synthetic pyrethroids: Occurrence and behavior in aquatic environments*, 991, 310-335.

Werner, I., Geist, J., Okihira, M., Rosenkranz, P., & Hinton, D. E. (2002). Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Environmental Research*, 54(3-5), 609-614.

Wilcove, D. S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., & Losos, E. (1998). Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience*, 48(8), 607-615.

Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2021). Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 109103.