

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

Aline Teixeira Marins

**BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ:
AVALIAÇÃO DE PESTICIDAS E SEUS EFEITOS EM PEIXES**

Santa Maria, RS
2020

Aline Teixeira Marins

**BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ:
AVALIAÇÃO DE PESTICIDAS E SEUS EFEITOS EM PEIXES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Bioecologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Biodiversidade Animal**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vania Lucia Loro

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Marins, Aline

BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ: AVALIAÇÃO DE PESTICIDAS E SEUS EFEITOS EM PEIXES / Aline Marins.- 2020.

125 p.; 30 cm

Orientadora: Vania Loro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2020

1. Bioindicador 2. Biomarcador 3. Ecotoxicologia 4. Peixes 5. Poluição aquática I. Loro, Vania II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ALINE MARINS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Aline Teixeira Marins

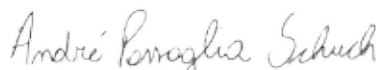
**BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ:
AVALIAÇÃO DE PESTICIDAS E SEUS EFEITOS EM PEIXES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Bioecologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Biodiversidade Animal**.

Aprovado em 20 de março de 2020:



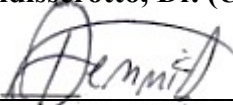
Vania Lucia Loro, Dra. (UFSM) - Videoconferência
(Presidenta/Orientadora)



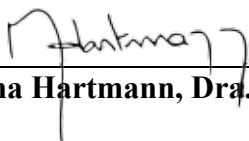
André Passaglia Schuch, Dr. (UFSM) - Parecer



Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM) - Parecer



Dennis Guilherme da Costa Silva, Dr. (FURG) - Parecer



Marilia Teresinha Hartmann, Dra. (UFFS) - Parecer

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Houve momentos em que o fardo parecia pesado demais,

“mas te vejo e sinto

o brilho desse olhar,

que me acalma

e me traz força pra encarar tudo”,

por isso, Pedro, dedico essa tese a ti.

AGRADECIMENTOS

A pós-graduação é um caminho árduo a ser trilhado, mas que se torna mais fácil quando encontramos pessoas especiais no percurso.

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, especialmente minha mãe Ana Marins, minha irmã Renata Marins e sogra Neusa Pinto, as quais o suporte e apoio foram essenciais à realização desse trabalho;

Ao meu companheiro Pedro Leão, a quem serei eternamente grata por ter entrado em minha vida, por sua paciência, suporte, aconchego, incentivo, companheirismo e principalmente amor;

À minha orientadora Vania Loro, por ter me acolhido e oportunizado crescimento como docente e pesquisadora;

Ao meu amigo e colega Eduardo Severo, o qual sou muito grata pelo apoio técnico, conversas (acadêmicas e nerds), sendo essencial para me manter no prumo e executar essa pesquisa, és um excelente pesquisador e professor;

À minha amiga e colega Cristina Cerezer, pela amizade, apoio técnico, emocional, por acreditar em mim mais do que eu mesma, és uma grande Pesquisadora;

Aos meus amigos e colegas maravilhosos, muito obrigada por essa amizade que torna a vida mais leve: Cíntia Rodrigues, Maiara Costa, Mauro Nunes, e Talise Müller;

Aos colegas incríveis do Labtaq, Carjone Gonçalves, Danielle Fontoura, Gustavo Weimer e Jossiele Leitemperger pelo apoio e conversas;

Aos alunos da disciplina de Toxicologia Ambiental (2018-I e 2019-I), os quais me ensinaram muito e mostraram toda a beleza da docência;

Aos meus coautores, essenciais em todos os trabalhos;

Aos cidadãos de Cachoeira do Sul, que anonimamente nos auxiliaram desde a pescar os lambaris até desatolar os carros utilizados nas coletas;

À minha banca (qualificação e defesa) por aceitarem fazer parte deste momento tão importante para mim: Alexandre Arenzon, André Schuch, Bernardo Baldisserotto, Bibiana Moraes, Charlene Menezes, Denis Rosemberg, Dennis Costa, Leonardo Barcellos e Marília Hartmann;

À UFSM, ao PPG em Biodiversidade Animal, ao LARP e à CAPES;

A todos os jundiás, lambaris e tilápias que oportunizaram essa tese;

Muito obrigada a todos!

Estamos correndo todo esse risco para quê? Os historiadores futuros talvez se espantem com o nosso senso de proporção distorcido. Como é possível que seres inteligentes tenham almejado controlar umas poucas espécies indesejadas por um método que contaminou todo o meio ambiente e trouxe a ameaça da doença e da morte inclusive para sua própria espécie? Precisamos urgentemente acabar com essas falsas garantias, com o adoçamento das amargas verdades. A população precisa decidir se deseja continuar no caminho atual, e só poderá fazê-lo quando estiver em plena posse dos fatos. Nas palavras de Jean Rostand: a obrigação de suportar nos dá o direito de saber.

(Rachel Carson)

RESUMO

BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ: AVALIAÇÃO DE PESTICIDAS E SEUS EFEITOS EM PEIXES

AUTORA: Aline Teixeira Marins
ORIENTADORA: Vania Lucia Loro

As atividades antrópicas potencialmente poluidoras aumentaram em decorrência do crescimento populacional humano. Consequentemente, mais contaminantes são introduzidos no meio ambiente, como os pesticidas. A bacia hidrográfica do Baixo Jacuí está inserida em região de elevada produção agrícola e de pecuária, no entanto, carece de estudos acerca da presença de pesticidas em amostras de água bem como sobre o efeito destes em organismos não alvo. Desta maneira, o objetivo desta tese foi identificar e avaliar os efeitos de pesticidas presentes na bacia hidrográfica do Baixo Jacuí, na cidade de Cachoeira do Sul, RS, utilizando-se jundiás (*Rhamdia quelen*), lambaris (*Astyanax* spp.) e tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) como organismos bioindicadores. Realizou-se monitoramento de pesticidas em amostras ambientais coletadas no rio Jacuí, em três pontos amostrais na cidade de Cachoeira do Sul, RS. Em 2016 foram feitas coletas mensais e em 2017 coletas sazonais. Um total de 23 pesticidas foram detectados em amostras de água. Os grupos químicos que apresentaram maior frequência foram triazina, neonicotinoide, triazol e estrobilurina. Dentre os pesticidas detectados, apenas quatro apresentam valores limites estabelecidos pela legislação ambiental brasileira (2,4-D, atrazina, carbaril e simazina), estando as amostras abaixo destes. Dois organofosforados proibidos foram detectados em 2016: azinfós-etil e triclorfom. Evidencia-se a lixiviação de pesticidas de lavouras adjacentes bem como de inseticidas e carrapaticidas utilizados na produção animal, representando um possível risco aos organismos aquáticos. No Manuscrito 1 objetivou-se verificar respostas em biomarcadores bioquímicos em tilápias expostas à atrazina, azoxistrobina e imidacloprido, os pesticidas mais frequentemente detectados em 2016, de maneira isolada e em associação (Mix), em concentrações ambientais. O grupo Mix foi responsável pelo maior número de alterações, provavelmente devido aos efeitos combinados dos pesticidas. Estas respostas no grupo Mix evidenciam o potencial dos pesticidas induzirem estresse oxidativo e alterações no sistema antioxidante e na atividade da acetilcolinesterase (AChE), sendo um risco visto que no ambiente natural os organismos aquáticos estão expostos a uma grande variedade de compostos. No Manuscrito 2, jundiás foram expostos aos inseticidas imidacloprido e propoxur, de maneira isolada e em associação. Demonstramos que esses pesticidas, em concentrações ambientalmente relevantes, inibiram a atividade da AChE em tecido cerebral e alteraram biomarcadores relacionados ao equilíbrio redox nos tecidos analisados. No Manuscrito 3 realizou-se biomonitoramento no rio Jacuí, juntamente às coletas de amostras ambientais em 2017. Verificou-se que a presença de pesticidas no rio Jacuí esteve associada com alterações nos biomarcadores bioquímicos dos lambaris coletados. De maneira geral, nesta tese verificou-se ampla diversidade de pesticidas no rio Jacuí, bem como, mesmo em concentrações ambientais, os pesticidas utilizados nos bioensaios induziram maiores alterações em biomarcadores quando em associação do que em exposição ao composto isolado. Estes resultados ativam um alerta para que mais estudos sejam executados a fim de aumentar a compreensão dos efeitos das interações de diferentes contaminantes ambientais.

Palavras-chave: Biomarcador. Ecotoxicologia. Jundiá. Lambari. Poluição aquática. Tilápia.

ABSTRACT

LOWER JACUÍ BIOMONITORING: ASSESSMENT OF PESTICIDES AND THEIR EFFECTS ON FISH

AUTHOR: Aline Teixeira Marins
ADVISOR: Vania Lucia Loro

Potentially polluting anthropic activities have increased as a result of human population growth. Consequently, more contaminants are introduced into the environment, such as pesticides. The Lower Jacuí hydrographic basin is located in a region of high agricultural and livestock production, however, it lacks studies on the presence of pesticides in water samples as well as on their effect on non-target organisms. In this way, the objective of this thesis was to identify and evaluate the effects of pesticides present in the Lower Jacuí hydrographic basin, in the city of Cachoeira do Sul, RS, using silver catfish (*Rhamdia quelen*), lambaris (*Astyanax* spp.) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator organisms. Monitoring of pesticides was carried out on environmental samples collected in the Jacuí River, at three sampling points in the city of Cachoeira do Sul, RS. In 2016, monthly collections were made and in 2017, seasonal collections. A total of 23 pesticides were detected in water samples. The chemical groups that showed the highest frequency were triazine, neonicotinoid, triazole, and strobilurin. Among the pesticides detected, only four have limit values established by Brazilian environmental legislation (2,4-D, atrazine, carbaryl, and simazine), with samples below these. Two banned organophosphates were detected in 2016: azinphos-ethyl and trichlorfon. The leaching of pesticides from adjacent crops is evident, as well as insecticides used in animal production, representing a possible risk to aquatic organisms. In Manuscript 1, the objective was to verify responses in biochemical biomarkers in Nile tilapia exposed to atrazine, azoxystrobin and imidacloprid, the most frequently detected pesticides in 2016, in isolation and association (Mix) way, at environmental concentrations. The Mix group was responsible for the largest number of changes, probably due to the combined effects of pesticides. These responses in the Mix group show the potential of pesticides to induce oxidative stress and changes in the antioxidant system and acetylcholinesterase (AChE) activity, being a risk since in the natural environment aquatic organisms are exposed to a wide variety of compounds. In Manuscript 2 silver catfish were exposed to the insecticides imidacloprid and propoxur, alone and in combination. We demonstrated that these pesticides, in environmentally relevant concentrations, inhibited AChE activity in brain tissue and altered biomarkers related to the redox balance in the analyzed tissues. In Manuscript 3, biomonitoring was carried out on the Jacuí River, together with the collection of environmental samples in 2017. It was found that the presence of pesticides in the Jacuí River was associated with changes in the biochemical biomarkers of the collected lambaris. In general, in this thesis, there was a wide diversity of pesticides in the Jacuí River, as well as, even in environmental concentrations, the pesticides used in the bioassays induced greater changes in biomarkers when in association than in exposure to the isolated compound. These results trigger an alert for further studies to be carried out to increase the understanding of the effects of the environmental contaminant interactions.

Keywords: Aquatic pollution. Biomarker. Ecotoxicology. Lambari. Nile tilapia. Silver catfish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – População, produção de alimentos e uso de pesticidas no Brasil.....	22
Figura 2 – Rotas e destino de resíduos de pesticidas no ambiente.....	23
Figura 3 – Esquema mostrando a biomagnificação de pesticidas. Cores mais escuras indicam maior concentração do contaminante nos tecidos.....	24
Figura 4 – Representação esquemática da hierarquia nas respostas a poluentes em um sistema biológico.....	25
Figura 5 – Exemplo de espécies de peixes empregadas em estudos ecotoxicológicos.....	28

METODOLOGIA

Figura 6 – Mapa da região de pesquisa com demarcação dos pontos de coleta.....	32
--------------------------------------------------------------------------------	----

MANUSCRITO 1

Figure 1 – GST activity in gills (a), liver (b), brain (c), and muscle (d) of <i>Oreochromis niloticus</i> exposed to environmental concentrations of pesticide.....	56
Figure 2 – CAT activity in gill (a), liver (b), brain (c), and muscle (d) of <i>Oreochromis niloticus</i> exposed to environmental concentrations of pesticide.....	57
Figure 3 – AChE activity in the brain (a), and muscle (b) of <i>Oreochromis niloticus</i> exposed to environmental concentrations of pesticide.....	58
Figure 4 – Integrated biomarker response (IBR) of <i>Oreochromis niloticus</i> exposed to environmental concentrations of pesticide.....	59

MANUSCRITO 2

Graphical abstract.....	61
Figure 1 – Glutathione S-transferase (GST) activity in the gills (A), liver (C), brain (F), and muscle (H), catalase (CAT) activity in the gills (B), liver (D), brain (G), and muscle (I), and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver (E) of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to imidacloprid and propoxur.....	80
Figure 2 – The antioxidant capacity against peroxides (ACAP) in the gills (A), liver (C), and muscle (E), and reactive oxygen species (ROS) levels in the gills (B), liver (D), and muscle (F) of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to imidacloprid and propoxur.....	81
Figure 3 – Acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain (A) and muscle (B) of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to imidacloprid and propoxur.....	82
Figure 4 – A heatmap of the Spearman correlation matrix of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to imidacloprid and propoxur.....	83

MANUSCRITO 3

Figure 1 – Heatmap of the Spearman correlation matrix among biomarkers and abiotic parameters in <i>Astyanax</i> spp. from Jacuí River.....	99
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

DISCUSSÃO

Tabela 1 – Pesticidas detectados em amostras de água do rio Jacuí, em 2016 e 2017, classe, grupo químico, classificação toxicológica, proibição ao uso no Brasil e consumo no Rio Grande do Sul referente aos anos de coleta.....	107
Tabela 2 – Culturas autorizadas pela ANVISA aos pesticidas que foram detectados consecutivamente em 2016 e 2017 no rio Jacuí.....	109
Tabela 3 – Produção das principais culturas relacionadas aos pesticidas que foram detectados consecutivamente em 2016 e 2017 no rio Jacuí.....	109

MANUSCRITO 1

Table 1 – Water pesticide residues ($\mu\text{g.L}^{-1}$) from 2016 February to 2017 January at Jacuí River, RS, Brazil.....	53
Table 2 – LPO levels and CP content in gills, liver, brain, and muscle of <i>Oreochromis niloticus</i> exposed to environmental concentrations of pesticides.....	55

MANUSCRITO 2

Table 1 Imidacloprid and propoxur water chromatographic determination by LC-MS/MS.....	78
Table 2 TBARS levels and protein carbonyl content in the gills, liver, brain, and muscle of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to imidacloprid and propoxur.....	79

MANUSCRITO 3

Supplementary materials

Table S1 Range of physico-chemical parameters in water from Jacuí River, RS, Brazil.....	100
Table S2 Maximum and minimum values of pesticides residues ($\mu\text{g.L}^{-1}$) found in water samples from Jacuí River, RS, Brazil.....	101

SUMÁRIO

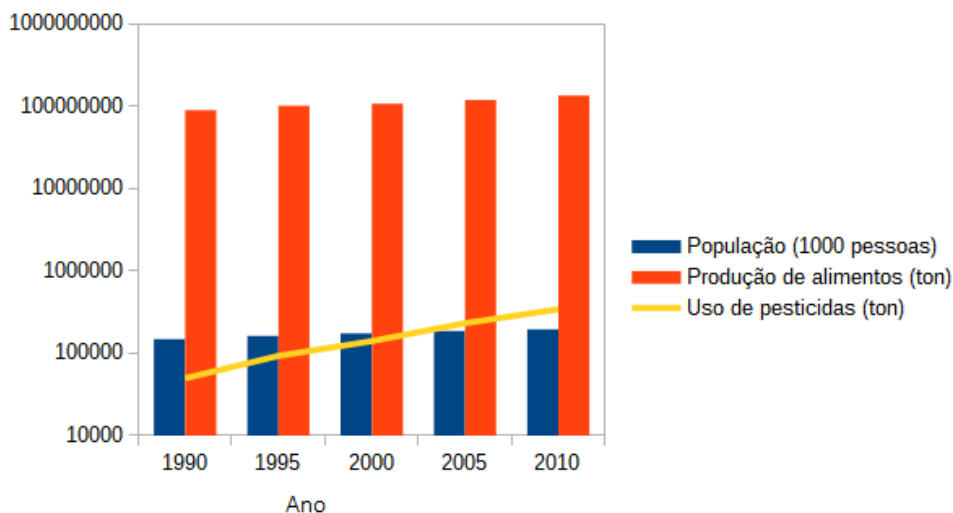
1	INTRODUÇÃO	21
2	HIPÓTESES	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	DESENVOLVIMENTO	32
5	MANUSCRITO 1 – Environmentally relevant pesticides induces biochemical changes in Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	34
6	MANUSCRITO 2 – A mixture of pesticides at environmental concentrations induces oxidative and cholinergic effects in <i>Rhamdia quelen</i>	60
7	MANUSCRITO 3 – Assessment of river water quality in an agricultural region of Brazil using biomarkers in a native neotropical fish, <i>Astyanax</i> spp. (Characidae)	84
8	DISCUSSÃO	102
8.1	PESTICIDAS NO RIO JACUÍ	102
8.2	EFEITO DE PESTICIDAS EM PEIXES	110
9	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DA CEUA	122
	ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISBIO	123

1 INTRODUÇÃO

Em 1962 foi publicado um livro que causou intensas discussões, desde pessoas leigas até cientistas e políticos, tendo grande repercussão em legislações ambientais. A publicação de “Primavera Silenciosa” (em inglês, *Silent Spring*) mostrou ao mundo uma preocupação nova, abrindo os olhos da população para o efeito colateral do uso despreocupado de certos produtos químicos, considerados até então inócuos ao homem e ao meio ambiente. Com a publicação deste livro, Rachel Carson realizou importante contribuição para a defesa do meio ambiente, culminando inclusive com a proibição do uso do diclorodifeniltricloroetano (DDT). Mais de meio século depois, os resultados de pesquisas e levantamentos estatísticos continuariam inquietando esta grande mulher inspiradora.

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial cresceu 191% desde 1950 até 2015 (UN, 2020). Com o crescimento populacional humano a agricultura aprimorou-se com o intuito de ser mais produtiva, culminando com a necessidade de aplicação de pesticidas durante o cultivo (SILVA e FAY, 2004). Dados da FAO (sigla do inglês *Food and Agriculture Organization*) mostram que o Brasil seguiu essa tendência mundial. Entretanto, o aumento no uso de pesticidas (589%) foi maior do que da produção de alimentos (52%) e do crescimento populacional (32%), de acordo com os dados de 1990-2010 (Figura 1) (FAO, 2020a,b,c). Assim como outros tipos de poluentes, como os efluentes industriais, esgotos domésticos, produtos oriundos da queima de combustíveis fósseis, domissanitários, etc., os resíduos de produtos agrícolas inevitavelmente alcançam os recursos hídricos (AMIARD-TRIQUET et al., 2015). Atualmente, os pesticidas são considerados um dos tipos de poluentes emergentes, ou seja, não são frequentemente monitorados, porém apresentam o potencial de causar efeitos adversos nos ambientes aquáticos bem como à saúde humana (GEISSEN et al., 2015).

Figura 1 – População, produção de alimentos e uso de pesticidas no Brasil

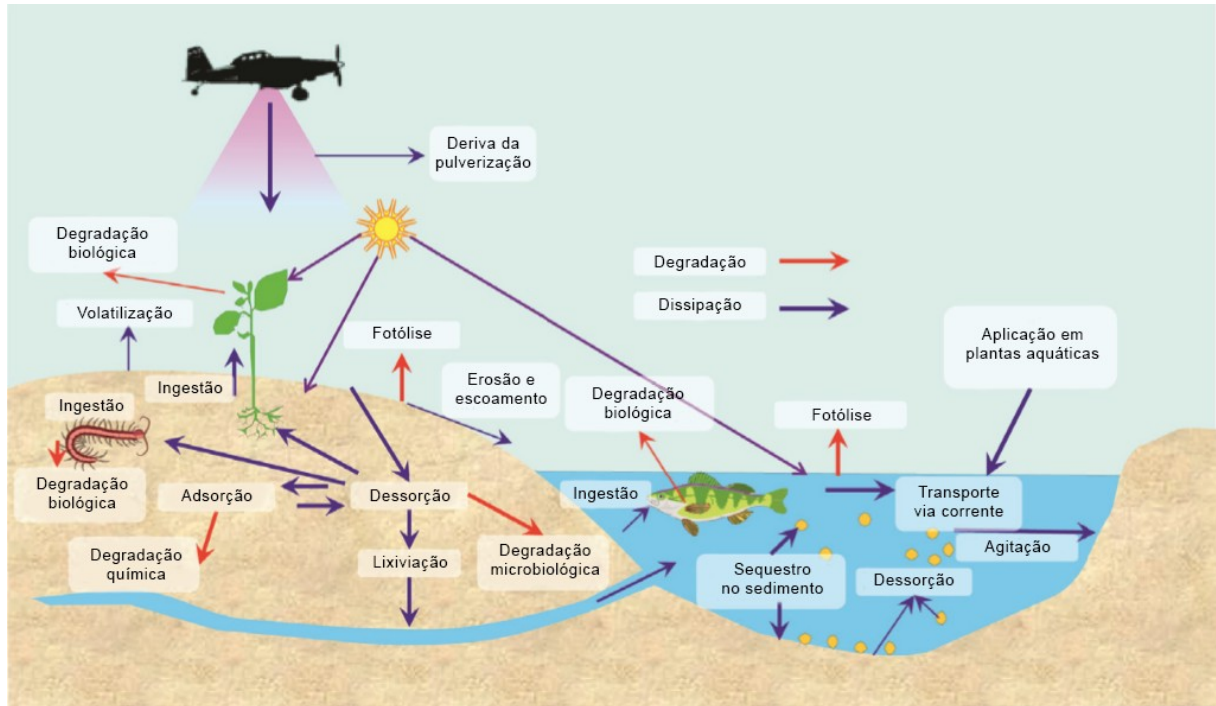


Fonte: Adaptado de FAO – Food and Agriculture Organization, 2020a,b,c.

Quando liberados no ambiente, os pesticidas podem sofrer degradação abiótica (reações químicas e fotoquímicas) ou biológica através de reações enzimáticas. Estas reações são realizadas principalmente por micro-organismos do solo, não significando, no entanto, que os compostos se tornam obrigatoriamente menos tóxicos (SILVA e FAY, 2004; SPARLING, 2016). No ambiente aquático encontra-se uma grande diversidade de poluentes, podendo reagir entre si ou com as diferentes matrizes ambientais, o que pode alterar sua biodisponibilidade. Desta interação podem ocorrer efeitos aditivos, sinérgicos, bem como antagônicos nos organismos expostos (AMIARD-TRIQUET et al., 2015). Atualmente, investigar os efeitos de múltiplos estressores em conjunto é uma necessidade, principalmente na América Latina, que apresenta grande diversidade climática, ambiental bem como de fontes poluidoras (FURLEY et al., 2017).

Trabalhos de monitoramento de pesticidas em recursos hídricos têm reportado a presença de grande diversidade de princípios ativos. Herbicidas, inseticidas assim como fungicidas são detectados em amostras de água e de sedimento (LORO et al., 2015; ETCHEGOYEN et al., 2017; DO AMARAL et al., 2018; DEKNOCK et al., 2019; SEVERO et al., 2020). A presença de pesticidas em amostras ambientais revela a lixiviação e escoamento superficial de resíduos a partir de lavouras adjacentes aos riachos e rios, como demonstrado na Figura 2.

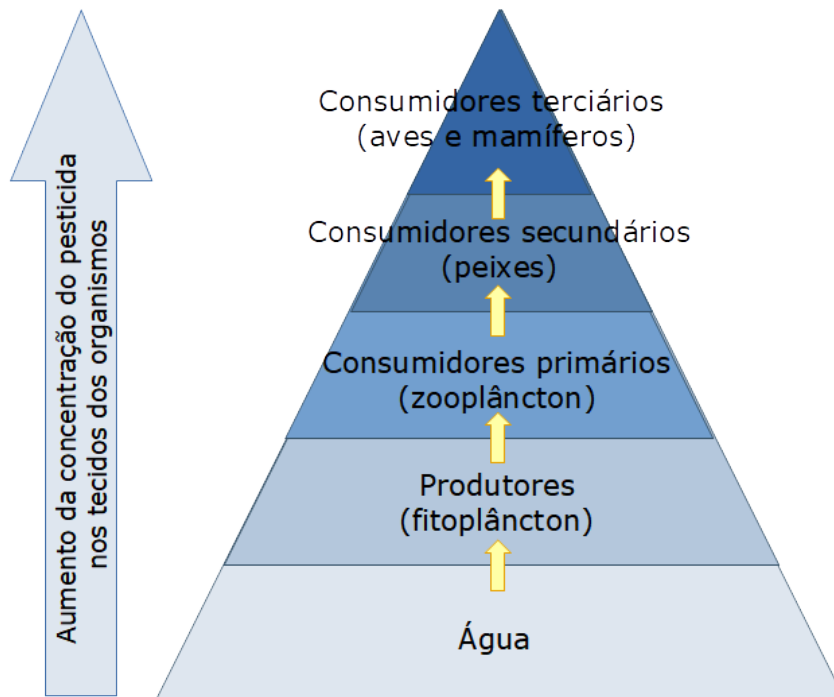
Figura 2 – Rotas e destino de resíduos de pesticidas no ambiente



Fonte: adaptado de Solomon et al., 2013, p. 373.

Alguns desses compostos são lipofílicos, tendo a capacidade de ficar aderido aos tecidos gordurosos dos organismos expostos. Este acúmulo pode ocorrer via exposição na água – caracterizando a bioconcentração – ou através da dieta – culminando com a biomagnificação, acumulando maiores concentrações dos compostos no topo da cadeia alimentar (Figura 3) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; SPARLING, 2016). O acúmulo de pesticidas em tecidos de peixes são relatados em coletas de campo bem como em experimentos laboratoriais (OLIVEIRA, F. et al., 2015; ITURBURU et al., 2017; MARINS et al., 2018). Estes fatos evidenciam o risco aos ecossistemas aquáticos bem como de exposição humana via dieta.

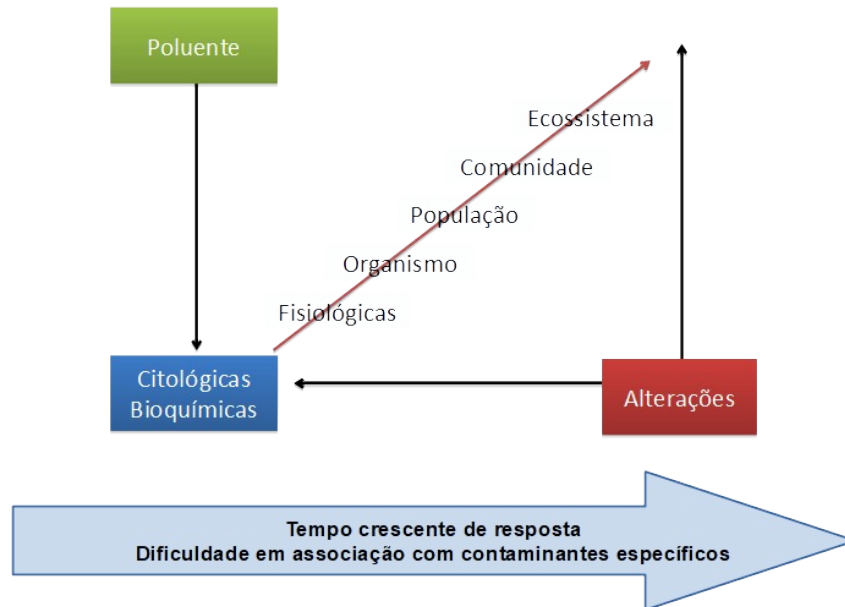
Figura 3 – Esquema mostrando a biomagnificação de pesticidas. Cores mais escuras indicam maior concentração do contaminante nos tecidos



Fonte: a autora.

A introdução de poluentes no ambiente acarreta a necessidade de uma avaliação de seus efeitos na biota, a curto e longo prazo (SISINNO e OLIVEIRA-FILHO, 2013). O efeito de um determinado contaminante pode ser avaliado em qualquer nível de organização biológico (Figura 4). No entanto, o uso de parâmetros mais basais, como análises bioquímicas e moleculares em tecidos de organismos expostos, tem sido empregado como primeiros sinalizadores de alterações, que ainda não são evidentes em níveis de organização mais complexos, como indivíduos e populações. Estes parâmetros são nomeados de biomarcadores, podendo ser classificados como biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade (VAN DER OOST et al., 2003; CAGNÉ, 2014).

Figura 4 – Representação esquemática da hierarquia nas respostas a poluentes em um sistema biológico



Fonte: adaptado de Zagatto e Bertolletti, 2008, p. 415.

Biomarcadores de exposição são parâmetros medidos no organismo bioindicador capazes de indicar a biodisponibilidade de um xenobiótico, sendo marcadores bem caracterizados de sua exposição a determinado composto (VAN DER OOST et al., 2003; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; HOOK et al., 2014). A atividade da enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALA-D) é um exemplo de biomarcador de exposição, sendo esta inibida em peixes expostos a metais (DOS SANTOS, C. et al., 2016; FIUZA et al., 2018).

Os biomarcadores de efeito são medidas que indicam alterações bioquímicas e fisiológicas associadas à exposição a um xenobiótico, indicando um possível comprometimento do organismo (VAN DER OOST et al., 2003; HOOK et al., 2014). São exemplos as medidas de atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), níveis de antioxidantes não enzimáticos, como tióis não proteicos e ácido ascórbico, conteúdo de proteína carbonilada, entre outros. As alterações variam, podendo os biomarcadores ser induzidos ou reduzidos após exposição a contaminantes (LORO et al., 2015, MARINS et al., 2018; LEITEMPERGER et al., 2019). Segundo alguns autores, é possível identificar um terceiro tipo de biomarcador, sendo ao mesmo tempo de

exposição e efeito. Eles indicam a ocorrência de um contaminante no ambiente bem como vinculam com especificidade um efeito no organismo devido exposição ao contaminante. Um exemplo é a medida da atividade da acetilcolinesterase (AChE), a qual é inibida por organofosforados e carbamatos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; ASSIS et al., 2012; SPARLING, 2016; GONÇALVES et al., 2018; PEREIRA et al., 2019).

Biomarcadores de suscetibilidade referem-se àqueles que auxiliam a compreender diferenças nas respostas dos indivíduos em uma mesma população. As diferenças podem ser oriundas de condições intrínsecas do organismo, como sexo, idade, polimorfismo, entre outros, que são responsáveis por gerar uma resiliência ou suscetibilidade no organismo a determinado contaminante (VAN DER OOST et al., 2003; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). São exemplos de biomarcadores de suscetibilidade diferenças individuais na toxicocinética e toxicodinâmica de determinado xenobiótico, mutações em enzimas de biotransformação, bem como na resposta de expressão gênica em determinadas enzimas a partir de fatores abióticos (SCHLENK, 1999). De acordo com Petitjean et al. (2019), essas diferenças nas respostas dos organismos, quando determinadas por uma característica hereditária (diferenças genéticas herdáveis em prole fértil), são responsáveis por uma adaptação ou extinção de uma população em um local que esteja sob influência de um estressor (por exemplo, pesticidas).

A fim de embasar as concentrações limites ambientais para compostos químicos necessita-se a realização de monitoramentos ambientais que permitam identificar risco de exposição bem como possíveis efeitos tóxicos destes contaminantes (SISINNO e OLIVEIRA-FILHO, 2013). O uso apenas de parâmetros de qualidade da água em avaliações ambientais subestima e oculta possíveis riscos à preservação da biodiversidade aquática. Alguns xenobióticos interagem entre si, podendo levar a efeitos não previstos quando isolados, como aumento da toxicidade, indução de estresse oxidativo, e desequilíbrio nas defesas antioxidantes (SHUKLA et al., 2017; WANG et al., 2017; DEMIRCI et al., 2018). Desta maneira torna-se necessário a análise de biomarcadores em organismos expostos (DOS SANTOS, D. et al., 2016).

Uma vez que a avaliação ambiental dos efeitos de um determinado poluente deve ser realística, uma metodologia amplamente indicada é a utilização de biomonitoramento. O biomonitoramento consiste em utilizar um organismo modelo, representativo ecologicamente do sítio de estudo. Neste organismo pode-se mensurar parâmetros diretos de contaminação

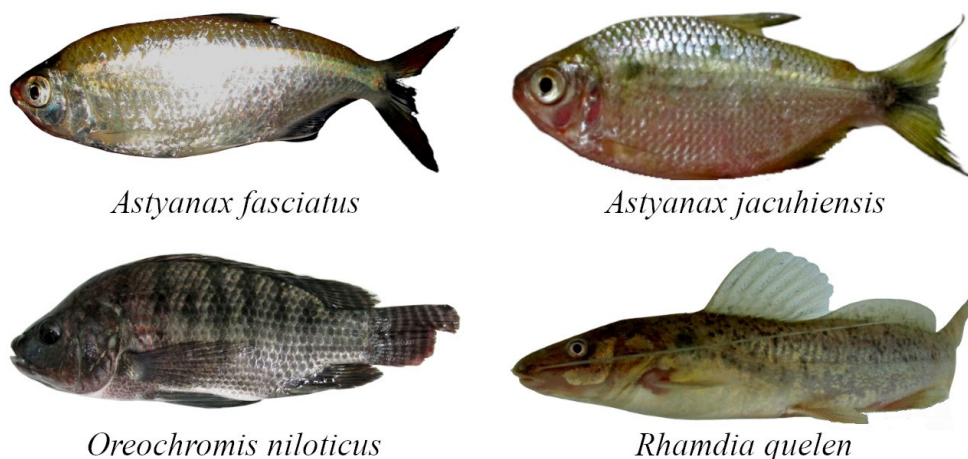
ambiental (como a determinação da concentração do poluente nos tecidos) ou indiretos, através do uso de biomarcadores e indicadores ecológicos (SISINNO e OLIVEIRA-FILHO, 2013). Estudos evidenciam a importância do uso de biomonitoramentos em ecossistemas aquáticos, tanto em ambientes lênticos como lóticos (LORO et al., 2015). Embora os contaminantes possam apresentar concentrações desprezíveis nos corpos de água (níveis muitas vezes não quantificáveis), diferentes metodologias de biomonitoramento detectam disfunção endócrina, neurotoxicidade, indução de quebras no DNA e malformações nucleares, estresse oxidativo, entre outras alterações, tanto em organismos coletados, como expostos *in situ* ou sob condições laboratoriais a amostras de água (DOS SANTOS, D. et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019; FRANCISCO et al., 2019).

A avaliação de toxicidade bem como possíveis impactos de um contaminante pode ser realizada em uma grande variedade de organismos. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), por exemplo, apresenta uma biblioteca de diretrizes metodológicas para avaliar os potenciais efeitos de produtos químicos na saúde humana e no meio ambiente. Utilizando desde microalgas, até invertebrados e vertebrados, esses métodos são aceitos e empregados mundialmente (OECD, 2020). Ao encontro com esta tendência mundial, a regulamentação brasileira, através da Lei nº 7.802/89, orienta para testes ecotoxicológicos, ficando proibido o registro e uso de pesticidas “cujas características causem danos ao meio ambiente” (BRASIL, 1989).

Dentre os organismos aquáticos, os peixes são amplamente utilizados em ensaios de toxicologia ambiental devido a suas vantagens, como: ampla distribuição (ocorrendo em grande variedade de habitats), diversidade de espécies, fácil identificação e podem informar sobre tendências de toxicidade através de variadas metodologias (GRABARKIEWICZ e DAVIS, 2008). Diferentes espécies de peixes (Figura 5) têm sido empregadas em biomonitoramentos bem como ensaios toxicológicos, mostrando a versatilidade desse grupo em investigações sobre o efeito de contaminantes ambientais, inclusive pesticidas. Estudos de avaliação de qualidade ambiental têm empregado espécies do gênero *Astyanax* (Characiformes: Characidae). Popularmente conhecidos como lambaris, são organismos com boa sensibilidade para a indicação de alterações reprodutivas, genotoxicidade, estresse oxidativo, e neurotoxicidade induzidos por exposição a contaminantes ambientais (LORO et al., 2015, GONÇALVES et al., 2018; FRANCISCO et al., 2019; TINCANI et al., 2019). Outra espécie de peixe nativo amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos é a *Rhamdia*

quelen (Siluriformes: Pimelodidae), conhecida como jundiá. Estudos têm demonstrado a eficácia no uso de jundiás na detecção de neurotoxicidade, estresse oxidativo, alterações no sistema antioxidante, disfunções na função energética e osmorregulatória, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzidos por exposição a pesticidas (MELA et al., 2013; BALDISSERA et al., 2018ab). A exposição de jundiás a misturas de contaminantes tem induzido maiores alterações do que a compostos isolados, evidenciando o risco aos ecossistemas aquáticos (BECKER et al., 2009; OLIVEIRA, H. et al., 2015; BARRETO et al., 2019). Embora o uso de espécies nativas seja encorajado em estudos ecotoxicológicos (FURLEY et al., 2017), algumas espécies de peixes exóticas apresentam boa aplicabilidade, principalmente por apresentar ampla disponibilidade de dados na literatura e facilidade de aquisição de espécimes com genética, sexo, peso e idade homogêneos. *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae), a tilápia do Nilo, é um exemplo de espécie exótica com ampla utilização em estudos de qualidade ambiental, tendo sido empregada em testes laboratoriais toxicológicos bem como em exposição *in situ*, evidenciando os efeitos de contaminantes emergentes no sistema imunológico, no crescimento e em biomarcadores de neurotoxicidade, genotoxicidade, disfunção endócrina e de estresse oxidativo (ASSIS et al., 2012; FUZINATTO et al., 2015; DOS SANTOS, D. et al., 2016; IBRAHIM et al., 2019).

Figura 5 – Exemplo de espécies de peixes empregadas em estudos ecotoxicológicos



Embora vários estudos tenham efetuado biomonitoramento de rios no Rio Grande do Sul concomitantemente com dosagem de pesticidas em amostras ambientais, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa (LORO et al., 2015; DO AMARAL et al., 2018; SEVERO et al., 2020), nenhum foi realizado no Baixo Rio Jacuí. Situada na parte médio-oriental do Rio Grande do Sul, a Bacia Hidrográfica do Baixo Jacuí corresponde uma área de 17.426,54 km². Abrange em torno de 40 municípios, dentre estes, Cachoeira do Sul (SEMA/DRH, 2012). Com uma estimativa de 82.201 habitantes, uma das principais fontes de receitas de Cachoeira do Sul é obtida pela produção agropecuária, proveniente de silviculturas, lavouras temporárias, lavouras permanentes e produção animal (IBGE, 2020).

Em 2010 a Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul realizou um estudo para identificar os pesticidas empregados em lavouras de abrangência da Bacia Hidrográfica do Baixo Jacuí. Verificou-se que os dez princípios ativos mais utilizados, em ordem decrescente de quantidade empregada, foram: glifosato, trifloxistrobina, imazetapir, tebuconazol, cipermetrina, óleo mineral, flumetralina, carbendazim, imazapic, e clomazone. Averiguou-se também que nesta bacia hidrográfica houve o emprego de 6,696 litros de pesticida por habitante no ano do estudo (CEVS/SES – RS, 2010). No entanto, não existem dados a respeito da presença de resíduos de pesticidas em amostras ambientais bem como de seus efeitos em organismos não-alvo.

O rio Jacuí possui grande importância econômica e ecológica para a região. É o hábitat de espécies endêmicas de peixes e invertebrados aquáticos, algumas delas ameaçadas, como os peixes anuais *Austrolebias cyaneus* e *Austrolebias litzi*, os caranguejos de rio *Aegla grisella* e *Aegla obstipa*, e o marisco-do-junco *Diplodon (Rhipidodonta) koseritzi* (ICMBio / MMA 2018). Desta maneira, tendo em vista o elevado emprego de pesticidas na região de abrangência do baixo Jacuí, e que o destino dos resíduos são os corpos d'água, é necessário averiguar possíveis efeitos destes em organismos aquáticos, a fim de contribuir com estudos futuros para a conservação da biodiversidade.

2 HIPÓTESES

Diante do exposto, a presente tese propõe investigar três hipóteses:

- a) A bacia hidrográfica do Baixo Jacuí, na cidade de Cachoeira do Sul, RS, devido sua inserção em região de intensa produção agrícola, apresenta alta diversidade de resíduos de pesticidas em amostras ambientais;
- b) Os pesticidas detectados na região de estudo são capazes de induzir alterações bioquímicas em peixes, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes;
- c) A exposição à mistura de pesticidas é responsável por causar maiores alterações bioquímicas em peixes do que o composto isolado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e avaliar os efeitos de pesticidas presentes na bacia hidrográfica do Baixo Jacuí, na cidade de Cachoeira do Sul, RS, utilizando-se jundiás (*Rhamdia quelen*), lambaris (*Astyanax spp.*) e tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) como organismos bioindicadores.

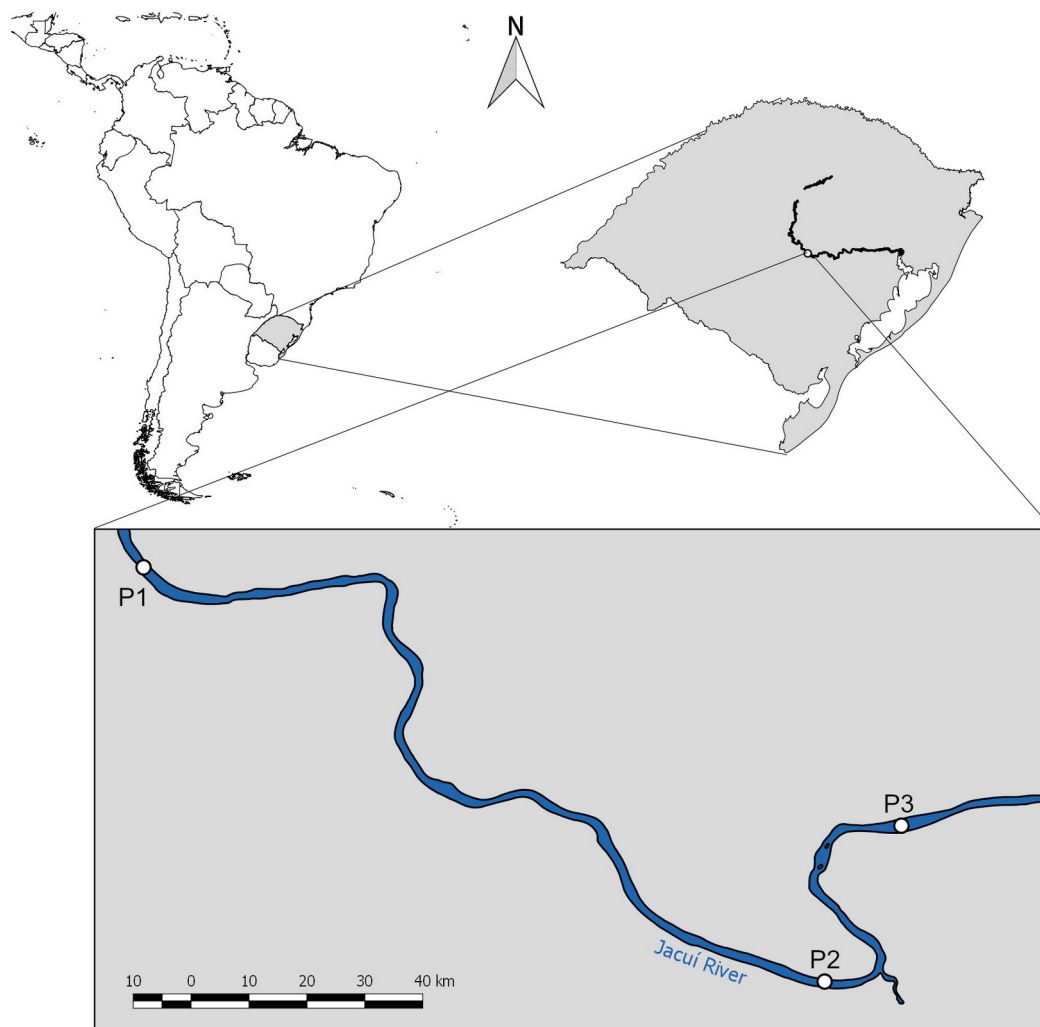
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar mensalmente a presença de pesticidas na bacia do baixo Jacuí;
- Identificar fungicida, herbicida e inseticida mais frequentes no rio Jacuí, realizando bioensaio laboratorial com tilápias do nilo a fim de verificar o efeito de interação desses compostos;
- Verificar a interação de dois inseticidas neurotóxicos detectados no rio Jacuí sobre respostas bioquímicas em jundiás;
- Realizar biomonitoramento sazonal, verificando se a presença de pesticidas no rio Jacuí interfere nos níveis dos biomarcadores em lambaris.

4 DESENVOLVIMENTO

O presente projeto está dividido em monitoramento ambiental, bioensaios laboratoriais e biomonitoramento. Os dados ambientais foram coletados em três pontos amostrais no Rio Jacuí, na cidade de Cachoeira do Sul, RS, Brasil (Figura 6). Ponto 1 (P1; 30°00'34.0''S 53°00'53.7''W) é 17 km distante do 2 (P2; 30°04'53.6''S 52°53'56.0''W). P2 está a 6 km do ponto 3 (P3; 30°03'13.9''S 52°52'57.1''W), estando separados pela Eclusa do Fandango.

Figura 6 – Mapa da região de pesquisa com demarcação dos pontos de coleta



Fonte: a autora.

O monitoramento mensal de resíduos de pesticidas em amostras de água superficial foi realizado de fevereiro de 2016 a janeiro de 2017. Verificou-se maior frequência do herbicida atrazina, do fungicida azoxistrobina e do inseticida imidacloprido, sendo estes utilizados em bioensaio laboratorial com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ambos dados estão no Manuscrito 1.

Um bioensaio laboratorial utilizando-se jundiás (*Rhamdia quelen*) foi realizado com o intuito de verificar alterações bioquímicas após exposição aos inseticidas imidacloprido e propoxur, compostos com frequente detecção nos rios brasileiros e que foram quantificados na bacia hidrográfica do baixo Jacuí. Estes dados estão apresentados no Manuscrito 2.

O biomonitoramento foi realizado sazonalmente em 2017. Lambaris (*Astyanax* spp.) foram coletados para dosagem de biomarcadores bioquímicos. Dados ambientais foram mensurados bem como quantificados resíduos de pesticidas na água, permitindo a correlação destes com alterações nos biomarcadores. Estes resultados estão no Manuscrito 3 (artigo aceito para publicação).

5 MANUSCRITO 1

**Environmentally relevant pesticides induces biochemical changes in Nile tilapia
(*Oreochromis niloticus*)**

Aline Teixeira Marins^{ac}, Eduardo Stringini Severo^{ac}, Cristina Cerezer^{ac}, Jossiele Wesz Leitemperger^{bc}, Talise Ellwanger Müller^b, Luana Floriano^d, Osmar Damian Prestes^d, Renato Zanella^d, Vania Lucia Loro^{abc*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

^c Laboratório de Toxicologia Aquática, Labtaq, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

^d Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

* Corresponding author:

Professor Dr^a Vania L. Loro, PhD

Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTaq)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

Phone: +55 55 3220-9456, e-mail: vania.loro@gmail.com

O manuscrito foi submetido ao periódico *Ecotoxicology*.

ABSTRACT

Increase demand for food elevates the entry of agricultural residues into water resources, a phenomenon that affects non-target organisms in different ways. Research on environmentally relevant pesticide effects (alone and in combinations) are scarce in the scientific literature. Thus, this study investigated: (1) the presence of pesticide residues in Jacuí River, an important Brazilian water source, during 1 year monitoring; and (2) the effects on *Oreochromis niloticus* of atrazine, azoxystrobin, and imidacloprid, the most frequently herbicide, fungicide and insecticide found during the monitoring. Twenty pesticide residues were detected in superficial water samples, two of them banned. In laboratory conditions, the fish were exposed to environmentally relevant pesticide concentrations in isolation or as mixtures. Biomarkers of oxidative damage, neurotoxicity, and antioxidant enzymes were measured. The *O. niloticus* response to pesticide exposure differed according to the tissue analyzed. The most affected tissue was the muscle, followed by brain, gills, and liver. *O. niloticus* exposed to the pesticide mixture exhibited the greatest changes, likely a result of the combined pesticide effects. The atrazine-exposed group presented the most pronounced alterations for the isolated exposure groups, followed by azoxystrobin and imidacloprid. Overall, pesticide exposure increased levels of oxidative stress parameters, reduced antioxidant enzyme activities, and induced acetylcholinesterase activity. These findings demonstrate the importance of research about interactions between pesticides, since they are often found simultaneously in the environment.

KEYWORDS: Atrazine. Azoxystrobin. Fish. Imidacloprid. Monitoring. Oxidative damage.

1 INTRODUCTION

World population growth has recently increased demand for food, and, consequently, elevated the use of artificial chemical compounds such as pesticides. In Brazil, 395,646 tons of active ingredients were used in 2015, a nearly 8-fold increase since 1990; 4.57 kg pesticides are used per cropland hectare (FAO 2018a). Pesticides reach non-target organisms through leaching, percolation, volatilization, and runoff from agricultural areas. When non-target organisms are exposed, oxidative stress, histological alterations, cholinesterase inhibition, reductions in body condition, behavioral alterations, mutagenic, and genotoxic effects may occur (Demirci et al. 2018; do Amaral et al. 2018; Shukla et al. 2017; Solomon et al. 2014). In addition to the above alterations, pesticide accumulation occurs in organisms collected from field studies and laboratory exposures (Brodeur et al. 2017; Marins et al. 2018; Samson-Robert et al. 2017). Furthermore, pesticides could fragment the habitat, which would isolate populations with a chemical barrier and lead to important ecological changes (Araújo et al. 2018).

Water monitoring based on eutrophication indicators or water quality parameters are insufficient to demonstrate the real condition and safety of aquatic environments. Pesticide data, and research about their biological effects, provide additional information about the pressure and risk to aquatic organisms and humans (López-Doval et al. 2017). However, studies that only consider individual pesticide exposure underestimate ecological risks, since miscellaneous compound mixtures usually co-exist in the environment. The sum of residues could have synergistic or antagonistic effects. Therefore, laboratory tests that use mixtures of various compounds are necessary to ascertain the interactions among them (Demirci et al. 2018; Shukla et al. 2017; Wang et al. 2017).

Several contaminants are present at low concentrations in aquatic environments. These xenobiotics could interact with animals and cause measurable biochemical alterations; these responses are referenced in the literature as biomarkers (Sparling 2016). Some biomarkers provide information about oxidative stress induction as well as xenobiotic elimination mechanism(s). Oxidative stress occurs when reactive oxygen species (ROS) production exceeds the ability of the organism to detoxify the reactive species. ROS react with cellular components, such as lipids and proteins, to cause lipid peroxidation (LPO) and carbonyl protein (CP) formation; both are measured as oxidative damage biomarkers. The antioxidant

system protects against ROS production by using enzymes including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT). Alterations in antioxidant enzyme activities indicate high ROS levels (Birnie-Gauvin et al. 2017; Lushchak 2015; Valavanidis et al. 2006). Besides oxidative stress and antioxidants biomarkers, aquatic pollutants may modify the activities of biotransformation enzymes, such as cytochrome P450 and glutathione S-transferase (GST). Changes in their activities denote an attempt to maintain homeostasis (Pereira et al., 2013). Further, acetylcholinesterase (AChE) is a valuable neurotoxicity biomarker, since this enzyme is inhibited by some contaminants (e.g., carbamates, organophosphate, and organophosphorus pesticides). Changes in AChE activity compromise neuromuscular junctions, which has crucial consequences (Murussi et al. 2015; Clasen et al., 2018). The use and validation of biomarkers are necessary to understand pesticide-induced alterations, and this endeavor will help develop valuable biomonitoring tools.

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an omnivorous tropical species that is cultivated worldwide. Using a variety of fish farming techniques, global production of this species in 2014 was 3,670,259 tons (FAO 2018b). In addition to the commercial relevance of *O. niloticus*, the use of this species as a bioindicator of water quality and in toxicological assessment has increased. It is a versatile organism that is well suited for a wide variety of studies and investigations of aquatic pollutants, in field studies and laboratory bioassays, and it acts as an indicator for the risk of human intoxication through its consumption. Dos Santos et al. (2016) utilized *O. niloticus* in a caged-exposure experiment to assess water quality in a reservoir used for human supply. The authors demonstrated that the use of biomarker and bioindicator organisms are essential to improve regulations and water resource monitoring. *O. niloticus* is also used in investigations of pollutants related to estuarine environments (Bacolod et al. 2017), freshwater contaminants, insecticides (Barbieri and Ferreira 2011; Toledo-Ibarra et al. 2016; Zahran et al. 2018), herbicides (de Almeida et al. 2018; Felício et al. 2018; Ventura et al. 2008), cyanotoxin (Guzmán-Guillén et al. 2015), and pharmaceutical drugs (Ajima et al. 2017).

Considering that chemical parameters are insufficient to estimate the safety of aquatic environments, laboratory investigations of pesticides interactions at environmentally relevant concentrations are scarce, and *O. niloticus* is well adapted to laboratory conditions, the goals of this study was multifold. First, we identified the presence of pesticides in an important Brazilian water supply, in the Lower Jacuí River Basin, over one year. Next, we investigated,

under laboratory conditions, the effects of the main herbicide, fungicide, and insecticide found in the Jacuí River on biochemical parameters of *O. niloticus* at isolated and mixed environmental concentrations.

2 MATERIALS AND METHODS

Our study was divided into two distinct phases. The first phase was environmental monitoring of the Lower Jacuí Hydrographic Basin, at Cachoeira do Sul city, RS, Brazil, over one year. Subsequently, in the laboratory phase, we selected the most frequently found compounds from the first phase and exposed the fish to these substances in isolation or mixtures.

2.1 ENVIRONMENTAL MONITORING

Pesticide monitoring was performed in the Lower Jacuí Hydrographic Basin, at Cachoeira do Sul city, RS, Brazil. The Jacuí River is located in a high-agricultural-activity region. According to the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2018), in 2016, soybeans, rice, wheat, maize, barley, rapeseed, tobacco, and rye occupied a total of 182,890 hectares of cultivated area and generated 734,789 tons of products in this town.

Surface water samples were collected monthly from February 2016 to January 2017 at three sampling sites in the Jacuí River. Sites 1 (S1; 30°00'34.0"S 53°00'53.7"W) and 2 (S2; 30°04'53.6"S 52°53'56.0"W) were located in monoculture interference sites, mainly from irrigated rice crops. Site 3 (S3; 30°03'13.9"S 52°52'57.1"W) was located in the urban area of Cachoeira do Sul.

2.1.1 Water analysis

Water samples were collected in 500 mL amber glass bottles and sent under refrigeration to the laboratory for pesticide residue analysis (Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, LARP, UFSM). Pesticide residue analysis was performed using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS and LC-MS/MS, respectively) according to methodology described by Donato et al. (2015). During

monitoring, the herbicide, fungicide, and insecticide most frequently encountered were atrazine (ATR), azoxystrobin (AZO), and imidacloprid (IMI), respectively. Thus, these pesticides were selected to investigate their effects on fish at environmental concentrations under laboratory conditions.

2.2 LABORATORY EXPOSURES

2.2.1 Chemicals

ATR (CAS Number 1912-24-9; 6-chloro-N²-ethyl-N⁴-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine), 98.1% purity, was obtained from Sigma Aldrich. AZO (CAS Number 131860-33-8; methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate), 99% purity, was purchased from Dr. Ehrenstorfer. IMI (CAS Number 138261-41-3; 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine), 98.5% purity, was obtained from Dr. Ehrenstorfer. All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and Merck (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2.2 Fish

Juvenile *O. niloticus* (weight 71.12 ± 17.39 g; length 16.19 ± 1.48 cm) purchased from a local fish farm (RS, Brazil) were acclimated to laboratory conditions (14 h light:10 h dark regime, temperature 24.43 ± 0.67 °C) in 250 L fiberglass boxes, 15 d prior to the tests. The fish were kept in a static system with continuously aerated and dechlorinated tap water. During acclimation, fish were fed twice daily with commercial fish pellets that contained 42% protein (Acqua Line, Supra, RS, Brazil). Residues were removed daily to maintain water quality. Total ammonia (0.41 ± 0.05 µg.L⁻¹), nitrite (0.018 ± 0.05 mg.L⁻¹), pH (7.46 ± 0.43), and dissolved oxygen (4.67 ± 0.65 mg.L⁻¹) were monitored daily. The study was approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of Universidade Federal de Santa Maria (protocol number 5537261016).

2.2.3 Experimental design

After the acclimation period, fish were divided into five experimental groups (n = 10 per group): Control (water without pesticide addition), ATR (0.56 $\mu\text{g.L}^{-1}$), AZO (0.024 $\mu\text{g.L}^{-1}$), IMI (0.11 $\mu\text{g.L}^{-1}$), and the Mix group (0.56 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ATR, 0.024 $\mu\text{g.L}^{-1}$ AZO, and 0.11 $\mu\text{g.L}^{-1}$ IMI). The chosen concentrations represented the maximum amounts found for each pesticide during the Jacuí River monitoring. Exposures lasted for 96 h, and during this period fish were not feed. At the end of the exposure period, *O. niloticus* were anesthetized with 75 mg.L^{-1} clove oil by immersion (Vidal et al. 2008) and euthanized by punching the spinal cord behind the operculum. Brain, gills, liver, and muscle were removed and stored at -80°C for further analysis. Water samples from exposure aquaria were collected at the beginning and end of the exposure time to measure pesticide concentrations, in accordance with Donato et al. (2015).

2.2.4 Biochemical analysis

Brain, gills, liver, and muscle samples were separately homogenized (1:20 w:v) with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), centrifuged (3,000 g for 10 min), and the supernatant was used for biochemical analysis. Protein content was determined using the methodology described by Bradford (1976) and expressed as $\text{mg protein.mL}^{-1}$. LPO levels, CP content, and GST and CAT activities were determined in all collected tissues. The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay was used to determine LPO levels, according to Draper and Hadley (1990), and expressed as $\text{nmol MDA.mg protein}^{-1}$. CP content was measured in accordance with Yan et al. (1995) and expressed as $\text{nmol carbonyl.mg protein}^{-1}$. GST activity was determined according to Habig et al. (1974) and expressed as $\mu\text{mol GS-DNB.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$. CAT activity was determined in accordance with Aebi (1984) and expressed as $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$. AChE activity was determined in brain and muscle tissues, according to Ellman et al. (1961), and expressed as $\mu\text{mol SCh.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

2.2.5 Integrated biomarker response (IBR)

The IBR methodology, in accordance with Beliaeff and Burgeot (2002) and modified by Sanchez et al. (2013), was applied to the average biomarker values. The IBR is represented

as star plot charts. Biomarker deviation compared to the control indicates induction (area above 0) or reduction (area below 0).

2.2.6 Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were tested for normality and homogeneity by Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Comparisons among groups were examined with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. We used $\alpha = 0.05$ as the significance threshold.

3 RESULTS

3.1 WATER ANALYSIS

Thirty-two water samples were analyzed, and all contained pesticides. Nine fungicides, 7 insecticides, and 4 herbicides were detected during monitoring. In descending order of frequency, the active ingredients were ATR, IMI, simazine, AZO, bentazon, tebuconazole, trichlorphon, quinclorac, propoxur, carbofuran, trifloxystrobin, fipronil, azinphos-ethyl, tetraconazole, carbaryl, propiconazole, metalaxyl, flutolanil, epoxiconazole, and dichlofluanid (Table 1). S1 contained more pesticide residues (51) than the other sampling sites (37 for S2 and 40 for S3). June had the lowest number of pesticides, while July had the highest. The herbicide ATR, the fungicide AZO, and the insecticide IMI were chosen for *O. niloticus* laboratory exposure due to their high-frequency rates. Furthermore, in April, August, October, and November, ATR, AZO, and IMI were simultaneously detected.

For the laboratory experiments, the ATR concentration in the ATR only group decreased by 35.56%. However, in the Mix group, ATR decreased by 18.60%. For the IMI group, IMI decreased by 14.29%, but only declined by 7.69% in the Mix group. The AZO concentration was lower than the quantification limit using this method, a fact that prevented its measurement and calculations of the percentage loss.

3.2 LABORATORY EXPOSURES

3.2.1 Biomarkers

In the gills, LPO levels were not statistically significantly different among groups. In the ATR and IMI groups, the CP content was lower compared to Control and Mix groups, and between the IMI and AZO groups, IMI had lower CP levels ($F_{4,25} = 12.75$; $p < 0.0001$; Table 2). GST activity decreased in the ATR, AZO and Mix groups compared to Control ($F_{4,25} = 11.74$; $p < 0.0001$). Further, GST activity declined in the ATR and AZO groups compared to IMI (Fig. 1a). CAT activity decreased in the Mix group compared with Control, AZO and IMI groups and increased in the AZO compared to the ATR group ($F_{4,25} = 9.010$; $p = 0.0001$; Fig. 2a).

In the liver, LPO levels were not significantly different among groups. In the ATR, AZO, and IMI groups, CP content was higher compared to the Control and Mix groups ($F_{4,25} = 17.42$; $p < 0.0001$; Table 2). GST activity declined in the ATR and AZO compared to the Control and Mix groups. Additionally, GST activity in the IMI group was reduced compared to Mix and increased compared with AZO ($F_{4,25} = 15.83$; $p < 0.0001$; Fig. 1b). CAT activity increased in the AZO compared to Control, ATR, and IMI groups ($F_{4,25} = 7.064$; $p = 0.0006$; Fig. 2b). Notably, the Mix group did not differ from the others groups ($F_{4,25} = 7.064$; $p = 0.0006$; Fig. 2b).

In the brain, LPO levels were higher in the ATR compared to Control, AZO and IMI groups; LPO was also higher in the Mix compared to Control and AZO groups ($F_{4,25} = 19.09$; $p < 0.0001$). CP content was not different among groups (Table 2). GST activity increased in AZO and Mix groups compared to Control. The ATR and IMI group GST activity declined compared with AZO ($F_{4,25} = 10.13$; $p < 0.0001$; Fig. 1c). CAT activity decreased in the IMI and Mix groups compared to Control ($F_{4,25} = 3.442$; $p = 0.0226$; Fig. 2c). Compared to control, AChE activity for the exposure groups was not significantly different. However, in the ATR group AChE activity decreased compared with the AZO and IMI groups, and it increased in the IMI group compared to Mix ($F_{4,25} = 7.314$; $p = 0.0005$; Fig. 3a).

In muscle, LPO levels were not statistically significantly different among groups. In the AZO, IMI and Mix groups, CP content was higher compared to Control and ATR groups ($F_{4,25} = 16.47$; $p < 0.0001$; Table 2). GST activity increased in the IMI compared to Control,

AZO, and Mix groups. In the ATR group, GST activity increased compared with Mix ($F_{4,25} = 10.14$; $p < 0.0001$; Fig. 1d). CAT activity declined in all exposure groups compared to Control ($F_{4,25} = 6.743$; $p = 0.0008$; Fig. 2d). Finally, AChE activity in the IMI and Mix groups increased compared to Control and ATR. The Mix group had elevated AChE activity compared to AZO ($F_{4,25} = 22.00$; $p < 0.0001$; Fig. 3b).

3.2.2 IBR

The Mix-exposed *O. niloticus* presented the highest IBR values. In descending order, IBR results were Mix > ATR > AZO > IMI groups (Fig. 4). IBR values emanate from induction and reduction in oxidative stress and antioxidant biomarkers, depending on the tissue evaluated. Overall, based on the sum of the measured biomarkers in all tissues, muscle exhibited the greatest change, followed by brain, gills, and liver (S values of 25.09, 22.47, 18.11 and 16.35, respectively; data not shown).

4 DISCUSSION

The present study monitored water pesticides for one year. The herbicide ATR, fungicide AZO, and insecticide IMI were the most frequently detected pesticides. In a similar way, these pesticides were also recorded in another Jacuí River study in region of the Passo Real reservoir, located in the Upper Jacuí Hydrographic Basin near cultivated fields (do Amaral et al. 2018). In our study, just three pesticides had a limit established in the Brazilian legislation, and all of them were bellow (CONAMA 2005). On the other hand, azinphos-ethyl as well as trichlorphon was banned to use in Brazilian territory in 2002 and 2010, respectively (ANVISA 2002, 2010). Since these organophosphorus pesticides were detected during the monitoring of Jacuí River, these raise our concern about the risk to the maintenance of biodiversity. In this way, more biomonitoring studies need to be to help in good agricultural practices and safeguard the aquatic ecosystems. Under laboratory exposure, pesticide percentage loss in the exposure aquaria differed among the compounds and exposure groups. Indeed, there was a difference in loss when the pesticide was introduced alone or in a mixture. These differences could explain some biochemical responses in the isolation and mixture groups. We hypothesize that ATR had greater affinity for uptake compared to IMI, given the

K_{ow} values of 2.61 and 0.57, respectively (PUBCHEM, 2020). Therefore, the higher ATR percentage loss compared to IMI can be explained by the possibly more hydrophobic ATR characteristics that facilitated its absorption by fish tissues. Unfortunately, we were not able to measure AZO in the water due to its very low concentration, a fact that hindered comparisons.

The *O. niloticus* response to pesticide exposure differed according to the analyzed tissue. As observed by Vieira et al. (2018), different organs exhibit divergent responses since the intrinsic antioxidant capacity varies among tissues, a phenomenon that provides diverse as well as complementary responses. The gills are the first organ in contact with the aqueous medium, and thus changes in this tissue probably occur immediately after exposure commences. Hence, there were few changes in this tissue for each pesticide compared to Control. However, the reduced GST activity in the ATR and AZO groups also occurred in the Mix group. GST activity reduction compromises pesticide metabolism by fish, a phenomenon that increases the risk of these chemicals damaging tissue biomolecules. Additionally, the reduced CAT activity recorded in the Mix group demonstrates the potentiated effect in pesticide mixtures, since this effect was not observed in the isolated groups. In summary, the gill GST and CAT activity reductions greatly cause impairment in the fish detoxification process.

The liver is an important detoxifying organ. CP induction in the ATR, AZO, and IMI groups signaled oxidative damage and redox imbalance. In the ATR and AZO groups, protein oxidation could be related to reduce GST activity that likely compromises the enzyme active site. Similarly, in *Cyprinus carpio* exposed to $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ATR, GST activity decreased in the liver and gills (Marins et al., 2018). Comparison of these results with the present study demonstrates that ATR cause damage to protein and enzymes even at low concentrations. AZO affects mitochondrial respiration, increases ROS production, and consequently damages proteins like GST and affects cellular homeostasis (Jiang et al. 2018; Olsvik et al. 2010). Besides the biochemical alterations in individual exposure groups, the changes induced by pesticides were not observed in the Mix group in this tissue. The liver probably utilized all antioxidant defenses to control oxidative damage induced by the pesticide mix.

The brain alterations demonstrated biochemical responses against pesticide poisoning. LPO induction in the ATR group suggests an inability of the tissue to combat the ATR-generated oxidative stress. Moreover, in the AZO group the GST activity induction could be related to lower LPO levels, since GST also eliminates lipid peroxides, as reported for

zebrafish poisoned with paraquat (Müller et al. 2018; Nunes et al. 2017). The induction of LPO and GST activity in the Mix group highlights the damage caused for a pesticide mixture and the brain detoxification response (i.e., increased GST levels). The CAT activity reduction induced by the pesticide treatments further indicate their oxidative damage capacity. The high ROS production in the Mix group possibly inactivated CAT and increased LPO levels beyond the detoxifying capacity of GST and others antioxidants expressed in this organ.

Muscle exhibited the most alterations compared to the other analyzed tissues. IMI primarily affected this tissue. The increased GST activity in the IMI group may represent an attempt to metabolize and excrete the pesticide that was not effective to prevent CP formation. The decreased CAT activity in all exposure groups could be due to excessive ROS production. The Mix group results indicated antioxidant impairment by pesticide mixture exposure. The AZO-mediated CAT activity decline could be related to increased protein oxidation. CP content increased in the AZO, IMI, and MIX groups, along with increased AChE activity. AChE is an important enzyme that regulates muscle tone and contraction. The increased AChE activity could decrease ACh levels in the neuromuscular junction, prevent muscular contraction, and consequently alter some fish behaviors, including food searching and predation defense.

An integrated biomarker analysis using IBR methodology allows identification of the group that undergo major changes as well as the general response of the organism. Whereas each pesticide produced an effect *per se*, the mixture promoted additive or synergistic effect, since the Mix group had the highest IBR value. Previous studies reported the presence of ATR, AZO, and IMI in freshwater resources as well as accumulated in fish from field studies (Brodeur et al. 2017; do Amaral et al. 2018; Hladik et al. 2018; López-Doval et al. 2017; Loro et al. 2015). Since these pesticides induced oxidative damage, deplete antioxidant enzymes, and elevate AChE activity under environmental concentrations, detection of these compounds in rivers and lakes signals threats to the aquatic ecosystem. Brazilian law established the maximum permitted ATR residue level at 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in freshwater destined for human consumption, after conventional treatment, and to protect aquatic communities (CONAMA 2005). There are no established limits for AZO or IMI in Brazil. This absence, and the effects reported below the ATR limits, indicates the risk of chronic exposure on aquatic organisms as well as humans, since very low concentrations of these pesticides were found in the Jacuí River throughout the year.

The findings in our work reinforce the necessity of studies with environmentally relevant pesticide concentrations that reach water resources, to understand the risk of exposure to non-target organisms. Moreover, since antioxidant adaptation varies temporally (Jiang et al. 2018), more studies that monitor time-dependent alterations would clarify the toxicological mechanism of the pesticides utilized in this work. Investigations about the effects of pesticide mixtures are necessary to simulate alterations in natural environments. This endeavor will improve our understanding and support regulations that protect aquatic environments.

5 CONCLUSIONS

To our knowledge, the present study was the first to monitor pesticides in the Lower Jacuí River Basin. Myriad compounds were found in this river, two of them banned in Brazilian territory. Additionally, laboratory exposure of Nile tilapia to three of the most frequent pesticides indicate biochemical alterations in numerous tissues, even with environmentally concentrations. These changes included oxidative damage, antioxidant enzyme alterations, and muscle AChE induction, notably upon exposure to the mixture of the three compounds. These findings highlight the threat of aquatic organisms, since they may be exposed to a wide variety of toxic compounds.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Agronomist Rodrigo Roso, Pedro Henrique Pinto Leão, and Renata Teixeira Marins for technical support. Special thanks to Bernardo Baldisserotto and Alexandre Arenzon. This work was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Vania Lucia Loro received research fellowship from CNPq (National Research Council), Process number: 309314/2017-8. Aline Teixeira Marins received a doctoral fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Ethical Statement

This study was approved by Animal Care Committee at University Federal of Santa Maria, under number: 5537261016. The authors declare that did not have conflict of interest in the present manuscript.

REFERENCES

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105,121–126.

Ajima M, Pandey P, Kumar K, Poojary N (2017) Neurotoxic effects, molecular responses and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to verapamil. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 196, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.03.009>

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2002) RDC nº 347 de 16 de dezembro de 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010) RDC nº 37 de 16 de agosto de 2010.

Araújo C, Silva D, Gomes L, Acayaba R, Montagner C, Moreira-Santos M, Ribeiro R, Pompêo M (2018) Habitat fragmentation caused by contaminants: Atrazine as a chemical barrier isolating fish populations. *Chemosphere*, 193, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.014>

Bacolod E, Uno S, Villamor S, Koyama J (2017) Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. *Mar Pollut Bull.* 124, 786-791. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.077>

Barbieri E, Ferreira L (2011) Effects of the organophosphate Folidol 600 on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pestic Biochem Physiol.* 99, 209-214.

Beliaeff B, Burgeot T (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 21, 1316–1322.

Birnie-Gauvin, K, Costantini, D, Cooke, S, Willmore, W (2017) A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish Fish.* 18, 928-942. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>

Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anall Biochem.* 72, 248-254.

Brodeur J, Sanchez M, Castro L, Rojas D, Cristos D, Damonte M, Poliserpi M, D'Andrea M, Andriulo A (2017) Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere.* 185, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.129>

Clasen B, Loro VL, Murussi CR, Tiecher TL, Moraes B, Zanella R (2018) Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system.

Science of the Total Environment. 626, 737–743.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.154>

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005) Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União. Nº 53, 58-63, March 18.

de Almeida M, Pereira T, Batlouni S, Boscolo C, de Almeida E (2018) Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquat Toxicol. 194, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.006>

Demirci Ö, Güven K, Asma D, Ögüt S, Uğurlu P (2018) Effects of endosulfan, thiamethoxan, and indoxacarb in combination with atrazine on multi-biomarkers in *Gammarus kischineffensis*. Ecotoxicol Environ Saf. 147, 749-758.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.038>

Do Amaral A, Gomes J, Weimer G, Marins A, Loro V, Zanella R (2018) Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. Chemosphere. 191, 876-885. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.114>

Donato F, Martins M, Munaretto J, Prestes O, Adaime M, Zanella R (2015) Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. J Braz Chem Soc. 26, 2077-2087. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150192>

dos Santos D, Yamamoto F, Filipak Neto F, Randi M, Garcia J, Costa D, Liebel S, Campos S, Voigt C, Ribeiro C (2016) The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply-Southern Brazil. Environ Sci Pollut Res. 23, 9625-9639. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>

Draper H, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 186, 421-431.

Ellman G, Courtney K, Andres J (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 7, 88-95.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018a) Pesticides use. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>, accessed in March 04, 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018b) Cultured Aquatic Species Information Programme: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en, accessed in March 06, 2018.

Felício A, Freitas J, Scarin J, Ondei L, Teresa F, Schelenk D, de Almeida E (2018) Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ecotoxicol Environ Saf. 149, 248-256.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.009>

Guzmán-Guillén R, Ortega A, Martín-Caméan A, Cameán A (2015) Beneficial effects of vitamin E supplementation against the oxidative stress on *Cyindrospermopsis*-exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicol.* 104, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2015.07.336>

Habig W, Pabst M, Jacoby W (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249, 7130-7139.

Hladik M, Corsi S, Kolpin D, Baldwin A, Blackwell B, Cavallin J (2018) Year-round presence of neonicotinoid insecticides in tributaries to the Great Lakes, USA. *Environ Pollut.* 235, 1022-1029. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.013>

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018) Produção agrícola municipal, tabela 3.21 – Rio Grande do Sul. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?&t=resultados>, accessed in January 22, 2018.

Jiang J, Shi Y, Yu R, Chen L, Zhao X (2018) Biological response of zebrafish after short-term exposure to azoxystrobin. *Chemosphere.* 202, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.055>

López-Doval J, Montagner C, de Albuquerque A, Moschini-Carlos V, Umbuzeiro G, Pompêo M (2017) Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. *Sci Total Environ.* 575, 1307-1324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.210>

Loro V, Murussi C, Menezes C, Leitemperger J, Severo E, Guerra L, Costa M, Perazzo G, Zanella R (2015) Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 13, 569-578. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140146>

Lushchak V (2015) Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol Biochem.* 42(2), 711-747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>

Marins A, Rodrigues C, de Menezes C, Gomes J, Costa M, Nunes M, Vieira M, Donato F, Zanella R, da Silva L, Loro V (2018) Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. *Ecotoxicol Environ Saf.* 151, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.021>

Müller T, Nunes M, Menezes C, Marins A, Leitemperger J, Gressler A, Carvalho F, de Freitas C, Quadros V, Fachinetti R, Rosemberg D, Loro V (2018) Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. *Mol Neurobiol.* 55, 1928-1941. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0441-6>

Nunes M, Müller T, Braga M, Fontana B, Quadros V, Marins A, Rodrigues C, Menezes C, Rosemberg D, Loro V (2017) Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish. *Mol Neurobiol.* 54, 3925–3934. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9919-x>

Murussi CR, Costa M, Menezes C, Leitemperger J, Guerra L, López T, Severo E, Zanella R, Loro V L. (2015) Integrated Assessment of Biomarker Response in Carp (*Cyprinus carpio*) and Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to Clomazone. Arch. of Environ. Contam. and Toxicol. 68, 646–654.

Olsvik P, Kroglund F, Finstad B, Kristensen T (2010) Effects of the Fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. Ecotoxicol Environ Saf. 73, 1852-1861.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.017>

Pereira L, Fernandes MN, Martinez, CBR (2013). Hematological and biochemical alterations in fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. Environ. Toxicol. and Pharmacol. 36, 1-8.

PUBCHEM – Open chemistry database. Atrazine, CID: 2256.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atrazine#section=Top>, accessed in March 04, 2018.

PUBCHEM – Open chemistry database. Imidacloprid, CID: 86418.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imidacloprid#section=Top>, accessed in March 04, 2018.

Samson-Robert, O, Labrie, G, Chagnon, M, Fournier, V (2017) Planting of neonicotinoid-coated corn raises honey bee mortality and sets back colony development. PeerJ, 5:e3670.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3670>

Sanchez W, Burgeot T, Porcher J (2013) A novel “Integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. Environ Sci Pollut Res. 20, 2721–2725.

Shukla S, Jhamtani R, Dahiya M, Agarwal R (2017) Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. Toxicol Rep. 4, 240-244. <http://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.002>

Solomon K, Dalhoff K, Volz D, Kraak G (2014) Effects of herbicides on Fish. Cap. 7, p.370-403. In: Tierney, K, Farrel, A, Brauner, C. Organic chemical toxicology of fishes. Fish Physiology. Academic Press. Amsterdam (The Netherlands) and Boston (Massachusetts): Elsevier. ISBN: 978-0-12-398254-4

Sparling D (2016) Chapter 3: bioindicators of contaminant exposure. Ecotoxicology Essentials: Environmental Contaminants and their Biological Effects on Animals and Plants, 45-66. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-801947-4.00003-2>

Toledo-Ibarra G, Díaz Resendiz K, Ventura-Ramón G, González-Jaime F, Vega-López A, Becerril-Villanueva E, Pavón L, Girón-Pérez M (2016) Oxidative damage in gills and liver in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 200, 3-8. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.007>

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 64(2), 178-189. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

Ventura B, de Angelis D, Marin-Morales M (2008) Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic Biochem Physiol.* 90, 42-51. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.009>

Vidal L, Albinati R, Albinati A, de Lira A, de Almeida T, Santos G (2008) Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesqui Agropecu Bras.* 43, 1069-1074.

Vieira C, Pérez M, Acayaba R, Raimundo C, Martinez C (2018) DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 195, 125-134.

Wang Y, Yu Y, Yang G, Xu Z, Wang Q, Cai L (2017) Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 170, 61-67. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>

Zahran E, Risha E, Awadin W, Palic D (2018) Acute exposure to chlorpyrifos induces reversible changes in health parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat Toxicol.* 197, 47-59. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.001>

TABLES

Table 1. Water pesticide residues ($\mu\text{g.L}^{-1}$) from 2016 February to 2017 January at Jacuí River, RS, Brazil

(To be continued)

Pesticide	Class	Limit ¹	February			April			May			June			July			August		
			S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Atrazine	H	2.00	<0.13	<0.13	<0.13	0.03	0.02	0.02	0.028	0.033	0.029	0.022	0.023	<0.02	0.2	0.2	0.21	0.04	0.04	0.02
Azinphos-ethyl ²	I	-	na	na	na									<0.02	<0.02					
Azoxystrobin	F	-				<0.02	<0.02											<0.02	<0.02	<0.02
Bentazon	H	-	<0.50																	
Carbaryl	I	0.02						<0.02												
Carbofuran	I	-																		
Dichlofluanid	F	-													0.061					
Epoxiconazole	F	-													0.074					
Fipronil	I	-																		
Flutolanil	F	-													<0.02					
Imidacloprid	I	-	<0.13	<0.13	<0.13	0.05	0.05	0.05	0.026	0.039	0.035	<0.02	<0.02	<0.02		0.05		0.03	0.03	0.07
Metalaxyl	F	-																		
Propiconazole	F	-													0.074					
Propoxur	I	-																<0.02	0.02	<0.02
Quinclorac	H	-	0.27	0.27	0.22	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Simazine	H	2.00				<0.02	<0.02		<0.02	<0.02	<0.02				<0.02			<0.02	<0.02	
Tebuconazole	F	-	<0.13		<0.13				<0.04	<0.04	<0.04				0.05					
Tetraconazole	F	-													0.15					
Trichlorphon ³	I	-	na	na	na															
Trifloxystrobin	F	-	na	na	na										0.061	<0.04	<0.04			

H: herbicide; I: insecticide; F: fungicide; na: not analyzed; ¹ Water residues limit ($\mu\text{g.L}^{-1}$; CONAMA 2005); ² banned (ANVISA 2002); ³ banned (ANVISA 2010); ⁴ not collected.

Table 1. Water pesticide residues ($\mu\text{g.L}^{-1}$) from 2016 February to 2017 January at Jacuí River, RS, Brazil

(Conclusion)

Pesticide	Class	Limit ¹	September			October			November			December			January		
			S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2 ⁴	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Atrazine	H	2.00	0.02	<0.02	<0.02	0.16	0.12	0.095	0.14		0.14	0.18	0.26	0.56	na	na	na
Azinphos-ethyl ²	I	-				na	na	na							na	na	na
Azoxystrobin	F	-				<0.02	<0.02		0.024								
Bentazon	H	-										0.43	0.5	0.59	<0.04	<0.04	<0.04
Carbaryl	I	0.02															
Carbofuran	I	-				<0.04			0.034		0.03						
Dichlofluanid	F	-				na	na	na	na		na	na	na	na	na	na	na
Epoxiconazole	F	-															
Fipronil	I	-						0.067									0.04
Flutolanil	F	-															
Imidacloprid	I	-	0.02	0.02	0.02	<0.02			<0.08		<0.08		<0.08	<0.08	0.08	0.11	0.08
Metalaxyl	F	-									<0.02						
Propiconazole	F	-															
Propoxur	I	-							0.027		0.039	na	na	na	na	na	na
Quinclorac	H	-	na	na	na	na	na	na	na		na	na	na	na	0.5	0.43	0.49
Simazine	H	2.00	<0.02	<0.02		0.048	0.027	0.032	0.051		0.048						
Tebuconazole	F	-														<0.08	
Tetraconazole	F	-												0.06			
Trichlorphon ³	I	-	0.18	0.26	1.23	0.045	0.073	<0.02									
Trifloxystrobin	F	-															

H: herbicide; I: insecticide; F: fungicide; na: not analyzed; ¹ Water residues limit ($\mu\text{g.L}^{-1}$; CONAMA 2005); ² banned (ANVISA 2002); ³ banned (ANVISA 2010); ⁴ not collected.

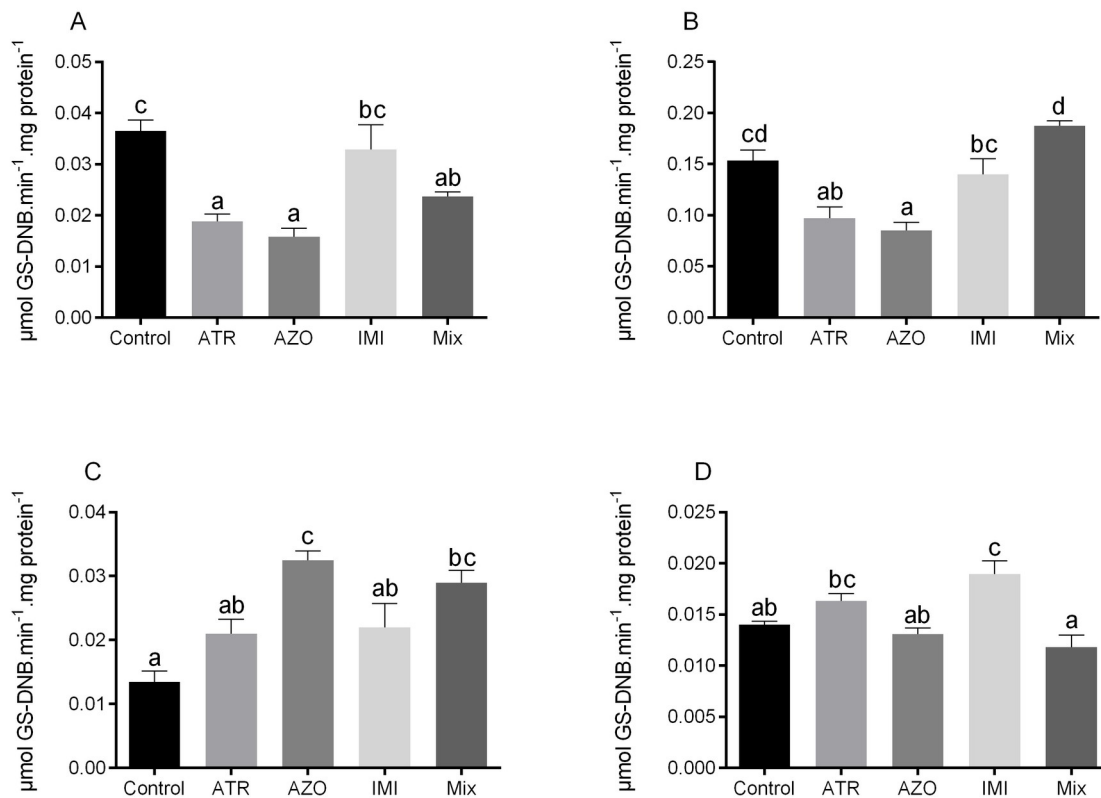
Table 2. LPO levels and CP content in gills, liver, brain, and muscle of *Oreochromis niloticus* exposed to environmental concentrations of pesticides

	Control	ATR	AZO	IMI	Mix
LPO					
Gills	1.10 ± 0.12	0.72 ± 0.07	0.94 ± 0.14	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.08
Liver	1.02 ± 0.07	0.87 ± 0.57	0.70 ± 0.25	0.68 ± 0.09	0.68 ± 0.05
Brain	0.86 ± 0.09^{ab}	1.57 ± 0.16^d	0.50 ± 0.03^a	1.14 ± 0.10^{bc}	1.38 ± 0.05^{cd}
Muscle	0.44 ± 0.05	0.40 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.02
CP					
Gills	7.80 ± 0.24^c	4.84 ± 0.61^{ab}	6.68 ± 0.75^{bc}	3.65 ± 0.31^a	7.70 ± 0.46^c
Liver	6.93 ± 0.25^a	10.22 ± 0.50^b	11.20 ± 0.49^b	9.17 ± 0.68^b	6.45 ± 0.44^a
Brain	7.32 ± 0.51	7.73 ± 0.65	6.77 ± 0.57	6.22 ± 1.33	7.53 ± 0.42
Muscle	7.81 ± 0.99^a	9.04 ± 0.48^a	14.99 ± 1.23^b	13.84 ± 0.66^b	17.42 ± 1.36^b

LPO was expressed as nmol MDA. mg protein⁻¹, and CP was expressed as nmol carbonyl. mg protein⁻¹. Data are reported as mean ± SEM. Different letters indicate statistical difference among groups.

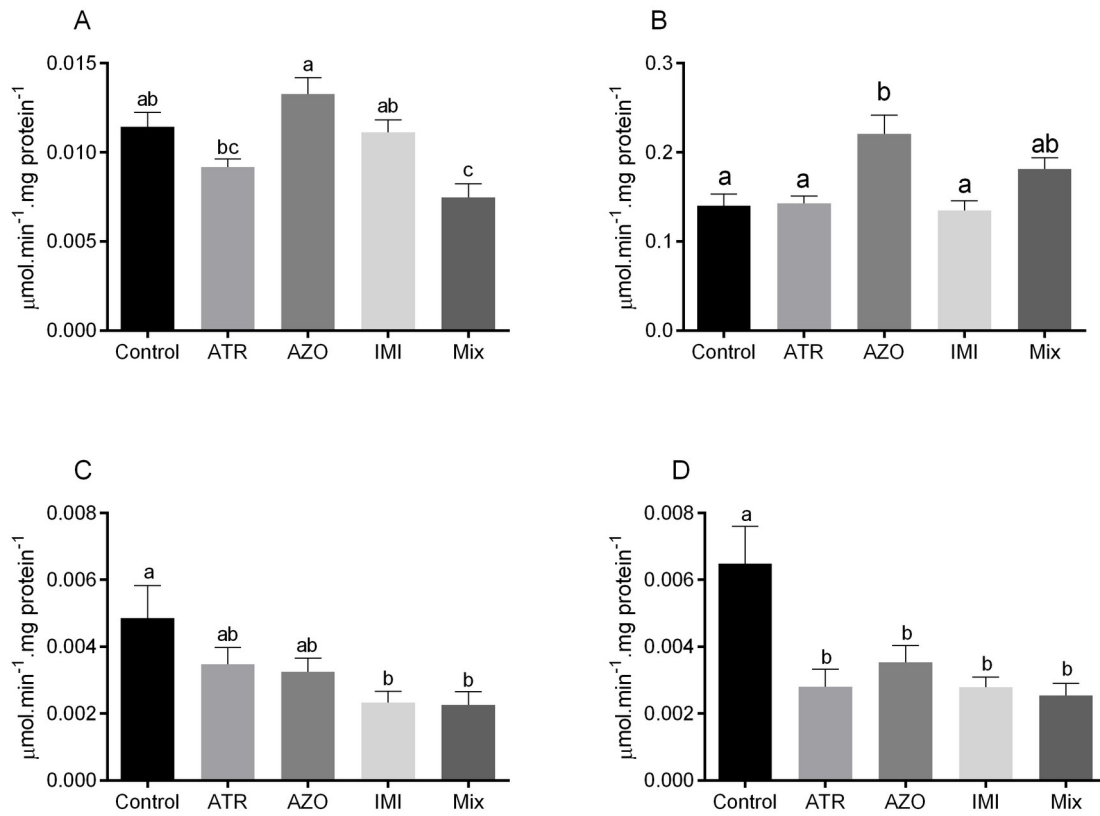
FIGURES

Fig. 1 GST activity in gills (a), liver (b), brain (c), and muscle (d) of *Oreochromis niloticus* exposed to environmental concentrations of pesticide



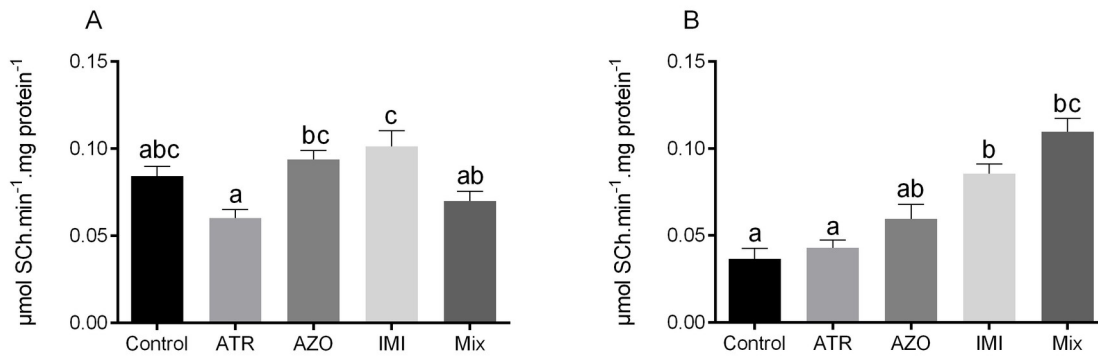
Data are reported as mean \pm SEM. Different letters indicate statistical difference among groups.

Fig. 2 CAT activity in gill (a), liver (b), brain (c), and muscle (d) of *Oreochromis niloticus* exposed to environmental concentrations of pesticide



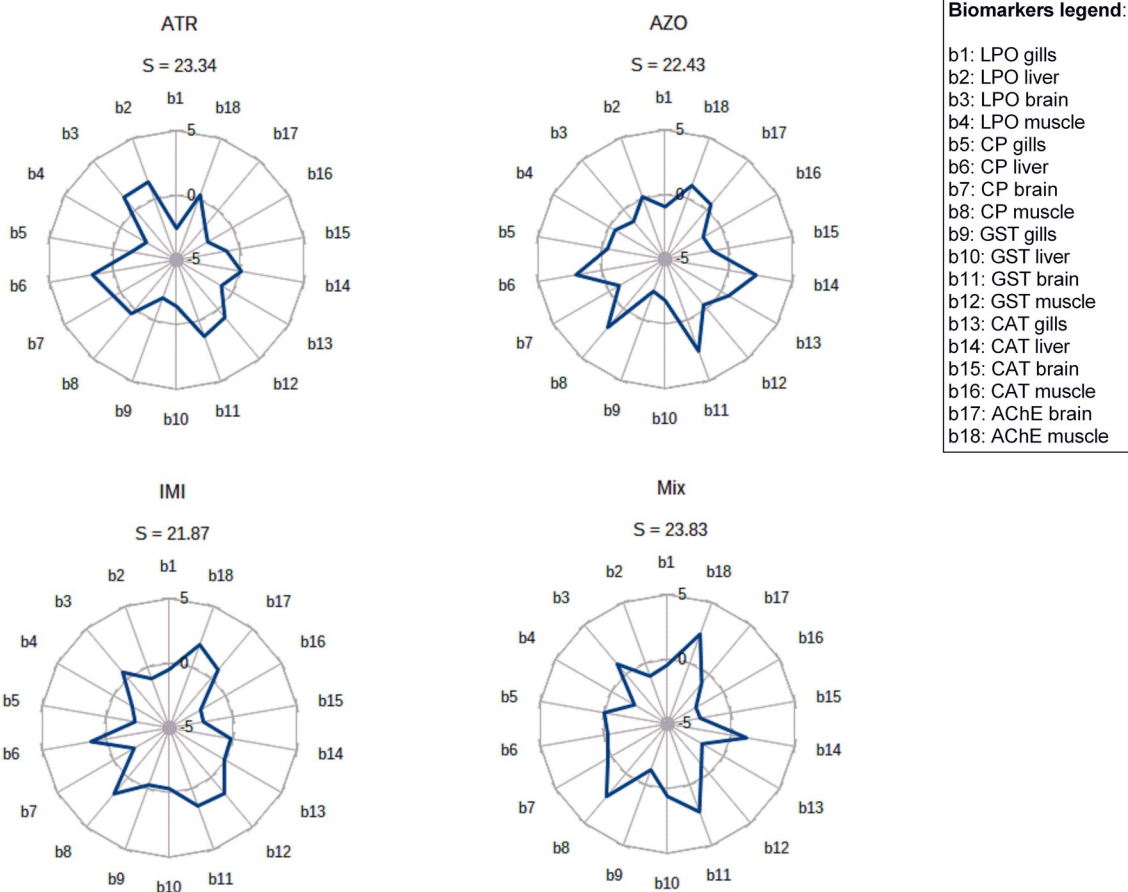
Data are reported as mean \pm SEM. Different letters indicate statistical difference among groups.

Fig. 3 AChE activity in the brain (a), and muscle (b) of *Oreochromis niloticus* exposed to environmental concentrations of pesticide



Data are reported as mean \pm SEM. Different letters indicate statistical difference among groups.

Fig. 4 Integrated biomarker response (IBR) of *Oreochromis niloticus* exposed to environmental concentrations of pesticide



6 MANUSCRITO 2**A mixture of pesticides at environmental concentrations induces oxidative and cholinergic effects in *Rhamdia quelen***

Aline Teixeira Marins^{ab*}, Cristina Cerezer^{ab}, Jossiele Wesz Leitemperger^b, Eduardo Stringini Severo^{ab}, Maiara Dorneles Costa^b, Danielle Ortiz Fontoura^b, Mauro Eugenio Medina Nunes^c, Lucila Cendon Ribeiro^d, Renato Zanella^d, Vania Lucia Loro^{ab*}

^a Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Ecologia e Evolução, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal;

^b Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Toxicologia Aquática, LABTAQ;

^c Universidade Federal do Pampa, Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia – CIPBIOTEC, Grupo de Pesquisa em Estresse Oxidativo e Sinalização Celular;

^d Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas, LARP.

* Corresponding author:

Professor Dr^a Vania L. Loro, PhD

Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTAQ)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105–900, Brazil.

Phone: +55 55 3220-9456, e-mail: vania.loro@gmail.com

O manuscrito foi submetido ao periódico *Ecotoxicology*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

The insecticides imidacloprid (IMI), a neonicotinoid, and propoxur (PRO), an N-methylcarbamate compound, are pesticides widely used throughout the world. Although they are not used together to combat pests, both are often found in freshwater near agricultural areas. Thereby, the goal of this study was to evaluate the additive effects of IMI and PRO mixtures at environmental concentrations in relation to isolated compounds on *Rhamdia quelen*, a neotropical fish. Briefly, *R. quelen* was exposed to IMI (0.11 µg/L), PRO (0.039 µg/L), or Mix (0.11 µg/L IMI plus 0.039 µg/L PRO) for 96 h. Glutathione S-transferase, superoxide dismutase, catalase, and acetylcholinesterase activities, thiobarbituric acid reactive substances levels, protein carbonyl and reactive oxygen species contents, and antioxidant capacity against peroxides were determined in gills, liver, brain and muscle tissues. For the first time, it was possible to observe that a mixture of these pesticides at environmental concentrations inhibited acetylcholinesterase activity in the brain and induced redox imbalance in all analyzed tissues. These results reinforce the concern regarding the pool of environmental contaminants present in water resources, which may present additive or synergistic effects that have not been studied yet.

KEYWORDS: Aquatic pollution. Biomarkers. Ecotoxicology. Freshwater. Neurotoxicity. Oxidative stress.

1 INTRODUCTION

Pesticides are biological, chemical, or physical agents that are applied to kill or mitigate pests. Insecticides from certain classes are used in agriculture and households, as well as to control ectoparasites in farmed and domestic animals (Lushchak 2011). These compounds are a diffuse source of pollution once they can spread far from their emission site. Indeed, these chemicals enter aquatic environments through air transport, runoff, and leaching (Geissen et al. 2015). For example, the insecticides imidacloprid (IMI) and propoxur (PRO), used worldwide, have been detected in freshwater monitoring in a range of 0.02 to 0.82 $\mu\text{g/L}$ and 0.01 to 29.1 $\mu\text{g/L}$, respectively (Loro et al. 2015; do Amaral et al. 2018; Sposito et al. 2018; Severo et al. 2020).

The neonicotinoid insecticide IMI is applied to a wide range of crops, including corn, fruits rice, soybeans, and wheat, and used for forestry and household purposes (ANVISA 2019). The main molecular target of neonicotinoids are nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in postsynaptic neurons to which they bind and cause continuous activation, resulting in neurotoxicity (Gibbons et al. 2014). Although IMI is considered to be toxic only to invertebrates, several studies have shown that it can cause a variety of side effects in freshwater fish, such as genotoxicity, oxidative damage, behavioral alterations, anxiogenic effects, and neurotoxicity (Crosby et al. 2015; Ge et al. 2015; Iturburu et al. 2017, 2018; Topal et al. 2017).

The N-methylcarbamate PRO is an insecticide and acaricide employed for household and agricultural purposes, including rice, maize, and forestry (FAO 2006). Although PRO is registered in many countries, it is not approved for cropland applications in Brazil, Europe, and the USA (WHO 2003; ANVISA 2019). PRO is considered moderately toxic to freshwater fish and highly toxic to freshwater invertebrates. It presents features that facilitate groundwater leaching (USEPA 1997), a phenomenon that poses risks to aquatic ecosystems. PRO inhibits the activity of acetylcholinesterase (AChE), which is responsible for controlling the nerve impulse in cholinergic synapses. Consequently, its inhibition interferes with nervous transmission in the synaptic cleft (FAO 2006). Fish exposed to sublethal PRO concentrations present impairments in growth and reproductive indices, as well as histopathological alterations, genotoxicity, embryotoxicity, and oxidative damage (Hanson et al. 2007; Gül et al.

2012; Pandey and Guo 2014; Gonçalves et al. 2018). These results draw attention to the possible effects on other non-target organisms, such as humans.

In Latin America, there is a necessity to improve the knowledge about the effects of realistic contaminant mixtures, especially using native species (Furley et al. 2017). The silver catfish (*Rhamdia quelen*), a species with commercial interest for human consumption (Baldisserotto 2009), represents a promising candidate as a bioindicator organism in aquatic toxicology studies. This neotropical freshwater fish is distributed from Mexico to central Argentina (Torres and Capuli 2019), and it can represent numerous biomes in toxicological studies. Although it is classified as Least Concern (LC) by the International Union for Conservation of Nature (IUCN), the presence of pollution from soil erosion, sedimentation, agrochemicals, and forestry effluents are some of the threats to *R. quelen* (IUCN 2019). In this view, some studies have utilized *R. quelen* to investigate neurotoxicity, bioenergetic dysfunction, and oxidative damage induced by exposure to thiamethoxam, a neonicotinoid insecticide (Baldissera et al. 2018a, b). However, there are no data in the literature on exposure of this species to IMI or PRO, especially mixtures of the two in concentrations found in rivers (Loro et al. 2015; do Amaral et al. 2018; Sposito et al. 2018; Severo et al. 2020). Further, the fish responses to pesticide exposure at sublethal concentrations call attention to the potential risk to other wild specimens.

Data on the interaction of contaminants, mainly related to IMI and PRO and at environmentally relevant concentrations, are lacking in the literature. This deficit is especially troubling because these insecticides are often found together in the environment (do Amaral et al. 2018; Severo et al. 2020). Therefore, we investigated the effect of isolated and mixed IMI and PRO exposure in silver catfish. We aimed to improve the understanding of how these insecticides interact to affect the oxidative status and cholinesterase response, using a promising native freshwater fish as bioindicator of pesticide exposure.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 CHEMICALS

IMI (CAS Number 138261-41-3; 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine), 98.5% purity, and PRO (CAS Number 114-26-1; 2-isopropoxyphenyl

methylcarbamate), 99.5% purity, were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Middlesex, England, UK). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) or Merck (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 EXPERIMENTAL DESIGN

Juvenile *R. quelen* (weight 3 ± 0.62 g; length 7 ± 0.71 cm) were obtained from a local commercial supplier. The fish were acclimated for 10 days to the laboratory conditions in 200 L fiberglass boxes under appropriate water conditions (pH 7.9 ± 0.17 ; temperature $24 \pm 0.5^\circ$ C) with a 14 h light:10 h dark photoperiod. They were fed twice daily with commercial fish pellets (Acqua Line, Supra, RS, Brazil). Total ammonia (0.09 ± 0.065 $\mu\text{g/L}$), nitrite (0.03 ± 0.013 mg/L), and dissolved oxygen (7 ± 0.30 mg/L) were monitored daily. The study was approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of Universidade Federal de Santa Maria (protocol number 5537261016).

After the acclimation period, the fish were randomly separated into four treatment groups (n = 10 per group): Control (insecticide absence), IMI (0.11 $\mu\text{g/L}$), PRO (0.039 $\mu\text{g/L}$), and Mix (0.11 $\mu\text{g/L}$ IMI plus 0.039 $\mu\text{g/L}$ PRO). During the exposure period (96 h), the fish were not fed. Pesticide residues were analyzed in water samples at the beginning and end of the exposure by liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry, in accordance with Donato et al. (2015). The pesticide concentrations were chosen based on data collected from water pesticide residue monitoring in a southern Brazil river near agricultural fields (Marins et al., paper under review).

After the exposure period, the fish were anesthetized with 50 mg/L clove oil by immersion (Cunha et al., 2010) and euthanized by punching the spinal cord behind the operculum. Gills, liver, brain, and muscle were quickly removed and stored at -80°C for further analysis.

2.3 BIOCHEMICAL ANALYSIS

Samples of gills, liver, brain, and muscle were separately homogenized with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) in a 1:20 (weight : volume) ratio. The homogenates were centrifuged (3,000 g, 10 min), and the supernatant was used in biochemical assays. The protein content

was determined following the method described by Bradford (1976), using albumin as a standard. Glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) activities, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, and protein carbonyl (PC) content were determined in all sampled tissues. GST activity was determined according to Habig et al. (1974) and expressed as $\mu\text{mol GS-DNB}/\text{min}/\text{mg}$ protein. CAT activity was determined in accordance with Nelson and Kiesow (1972) and expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. TBARS levels were measured according to Draper and Hadley (1990), using malondialdehyde (MDA) as a standard, and expressed as $\text{nmol TBARS}/\text{mg}$ protein. PC content was quantified in accordance with Yan et al. (1995) and expressed as $\text{nmol carbonyl}/\text{mg}$ protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined in the liver in accordance with Misra and Fridovich (1972) and expressed as international units (IU) of SOD/mg protein. Antioxidant capacity against peroxides (ACAP) and reactive oxygen species (ROS) content were determined in gills, liver, and muscle, in accordance with Amado et al. (2009) and Ali et al. (1992), respectively. ACAP was expressed as $1/\text{relative area of ROS}$, and ROS was expressed as $\text{nmol DFC}/\text{mg}$ protein. It was not possible to evaluate ACAP and ROS biomarkers in brain tissue due to the small amount of available sample. AChE activity was determined in brain and muscle, according to Ellman et al. (1961) and expressed as $\mu\text{mol SCh hydrolyzed}/\text{min}/\text{mg}$ of protein.

2.4 STATISTICAL ANALYSIS

The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The normality and homoscedasticity of the data were assessed using the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test was performed for statistical comparisons. Spearman correlation analysis among the biomarkers and the insecticides was also performed. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

3 RESULTS

By the end of the exposure period, IMI was reduced 19.38% and 2.83% in water treated with IMI and Mix, respectively. For PRO, the reduction was 42.86% and 38.46% for the PRO and Mix groups, respectively (Table 1).

With regard to GST activity, there was a decrease in the liver of fish exposed to IMI and Mix compared to control ($F_{3,20} = 5.033$, $p = 0.0093$) and in the brain compared to control and PRO ($F_{3,28} = 20.24$, $p < 0.0001$). In the muscle, IMI treatment increased GST activity compared to the other groups ($F_{3,28} = 11.66$, $p < 0.0001$). The gills GST activity was not statistically different among the groups (Fig. 1).

There was an increase in SOD activity in the liver of fish exposed to IMI, PRO, and Mix compared to control ($F_{3,20} = 6.682$, $p = 0.0026$; Fig. 1).

The gills from fish exposed to IMI or Mix showed elevated CAT activity when compared to the control ($F_{3,20} = 7.049$, $p = 0.0020$). In the liver, there was an increase in CAT activity in the IMI compared to the other groups and a decrease in fish exposed to PRO and Mix ($F_{3,28} = 46.68$, $p < 0.0001$). In the brain, PRO exposure decreased CAT activity compared to the control ($F_{3,20} = 4.526$, $p = 0.0141$). In the muscle, the Mix treatment increased CAT activity in comparison to the control ($F_{3,25} = 3.074$, $p = 0.0460$; Fig. 1).

The ACAP levels in the gills and liver were not different among the treatments. By contrast, the muscle from all exposure groups showed reduced ACAP levels when compared to the control ($F_{3,36} = 12.30$, $p < 0.0001$; Fig. 2).

In the gills, the IMI treatment induced the highest ROS content, followed by PRO exposure, compared to the control and Mix ($F_{3,26} = 35.83$, $p < 0.0001$). In the liver, the Mix treatment decreased the ROS content compared to the control and PRO groups ($F_{3,28} = 5.560$, $p = 0.0040$). In the muscle, the Mix treatment augmented ROS levels when compared to the control ($F_{3,26} = 4.782$, $p = 0.0088$; Fig. 2).

AChE activity in the brain decreased in all exposure groups, with statistically significant differences among the groups and in comparison to the control ($F_{3,26} = 39.57$, $p < 0.0001$). The AChE activity in the muscle was not statistically different among the groups (Fig. 3).

In the gills, the TBARS levels increased after IMI exposure when compared to the other groups ($F_{3,28} = 10.06$, $p = 0.0001$). In the liver, all exposure groups presented decreased TBARS levels when compared to the control ($F_{3,28} = 445.7$, $p < 0.0001$). In the brain, the TBARS levels also decreased after the PRO and Mix exposure compared to the control and IMI groups ($F_{3,27} = 36.89$, $p < 0.0001$). In the muscle, the Mix exposure increased the TBARS levels compared to other groups ($F_{3,28} = 10.67$, $p < 0.0001$; Table 1).

The PC content decreased in the gills from the PRO group when compared to the control and IMI treatments ($F_{3,28} = 6.995$, $p = 0.0012$). In the liver, there was an increase in the PC content in the PRO and Mix groups compared to the control and IMI treatments ($F_{3,28} = 32.59$, $p < 0.0001$). The brain from the IMI and Mix groups showed elevated PC content compared to the control and PRO groups ($F_{3,24} = 16.61$, $p < 0.0001$). In the muscle, the PC content decreased after the IMI and Mix treatment in comparison to the control and PRO ($F_{3,28} = 8.460$, $p = 0.0004$; Table 1).

Fig. 4 shows the correlation between the biomarkers as well as between the insecticides and biomarkers. A positive correlation coefficient indicates that the two variables have a direct relationship, i.e. both increase or decrease at the same time. On the other hand, a negative correlation represents an inverse relationship between the two variables. In sum, IMI presented more correlation results (10) compared to PRO (6). When each tissue was analyzed separately, the liver showed more correlations between their biomarkers (2), followed by the gills and brain (1 each). In the muscle, there were no correlations between the biomarkers.

4 DISCUSSION

In the current study, we evaluated the potential of IMI and PRO, pesticides that are commonly found in ecotoxicological studies, to induce biochemical responses in *R. quelen*. For the first time, we demonstrated that these pesticides, at environmentally relevant concentrations and in combination, inhibited AChE activity in brain tissue and altered several biomarkers related to oxidative imbalance in all analyzed tissues.

The fish were exposed to pesticides by immersion, a phenomenon that often occurs in the aquatic environment. Both groups were exposed under the same environmental conditions—only the type of pesticide varied. Therefore, the reduction in concentrations were different, possibly due to the chemical characteristics of each compound. In the Mix group, the decrease in concentrations at the end of the experimental period was lower compared to the isolated groups. These data suggested that some interaction between the compounds might have prevented fish absorption. Although IMI is believed to have a low affinity for tissue lipids and proteins, a study in *Oncorhynchus mykiss* demonstrated the possibility that IMI diffuses through the gill epithelium and can reach other tissues via blood flow (Frew et al. 2018). In this way, the gills would play a crucial role in the absorption of these compounds from water.

When absorbed, IMI is heterogeneously distributed in the organism and thus can generate tissue-specific responses. According to Iturburu et al. (2017), IMI is found in higher concentrations in nervous tissues due to its affinity for nicotinic receptors—and not because of the lipid composition of the tissue. To our knowledge, there are no PRO toxicokinetics studies. However, literature data support its ability to bioaccumulate in fish tissues collected from the environment (Oliveira et al. 2015). Although not measured, the compounds might have been retained to some extent in the *R. quelen* tissues. In the natural environment, if the clearance rates of the compounds in the organisms are lower than the exposure rates, some bioaccumulation is expected (Frew et al. 2018). In fact, besides biochemical changes to which the fish are exposed, there is concern about how pesticide interactions interfere with the ecosystem. Some fish are part of the diet of other organisms, being a possible source of human contamination (Brauner et al. 2012).

Rhamdia quelen exposed to IMI, PRO, or Mix showed tissue-specific results. Hence, the data required separate interpretations by tissue. The gills play a crucial physiological role in gas exchange, excretion, and osmotic balance. Disorders that affect this tissue can have harmful results (Iturburu et al. 2017). IMI exposure caused more alterations in gills compared to PRO and Mix exposure, mainly by induction of oxidative damage biomarkers and antioxidants response. The positive relationship among IMI exposure and CAT, ROS, and TBARS—and the positive correlation between TBARS and ROS in this tissue—indicate that, although these insecticides are neurotoxic, they have a secondary mechanism of toxicity that might be based on redox homeostasis. These results are consistent with Severo et al. (2020), where zebrafish embryos exposed to river water presented a positive correlation between IMI and TBARS levels and CAT activity. The increased steady-state ROS observed in IMI group might attack membrane lipids and lead to the observed TBARS elevation (Ge et al. 2015). TBARS is a biomarker of oxidative damage that is commonly used in toxicological studies; it contributes to measure the extent of oxidative damage from exposure to xenobiotics (Nunes et al. 2016). The exposure to PRO increased ROS generation; however, no oxidative effects were observed from this change in TBARS levels. Perhaps some unanalyzed antioxidant defense mechanism attenuated the lipid peroxidation. The presence of both insecticides in the Mix can result in a tendency for an additive effect in the GST activity, a phenomenon that might indicate the tissue's attempt to metabolize the compounds. Interestingly, there was an apparent antagonistic effect with regard to PC, TBARS, ROS, and ACAP levels that resulted

in a reduced antioxidant defense. Gonçalves et al. (2018) showed different results in gills from *Astyanax jacuhiensis* exposed to PRO, such as induction of PC and a decrease in the GST activity. These discrepancies from the present study might be due to species or concentration differences.

The liver showed the most alterations in the Mix group. Organisms are exposed to a myriad of compounds in the environment, and thus the intensity of the results in the Mix group raises concerns about the effects of aquatic contaminants. The negative correlation of SOD activity with TBARS levels might be explained by a reduction in the latter as a possible compensatory response. In agreement with these results, *Prochilodus lineatus* exposed to IMI presented SOD activity induction in the liver (Vieira et al. 2018). On the other hand, the negative correlation between CAT activity and PC levels might indicate protein damage that could affect the activity of this antioxidant enzyme, mainly in the PRO exposure group. Furthermore, IMI had a positive correlation with CAT activity; this increase in the antioxidant profile might prevent PC formation. Severo et al. (2020) showed a positive correlation between IMI concentrations and CAT activity. Those findings demonstrated that the pesticide exposure is a stimulus for increased antioxidant activity. Apart from the changes in the antioxidant system, the decrease in GST activity draws attention to possible deleterious effects on fish. This eventuality is worrisome, mainly in the natural environment where they are chronically exposed, leading to a reduction in the capacity to face aquatic pollutants.

The brain was the most affected by IMI exposure, as shown by the negative correlation of IMI with AChE and GST activities and positive correlation with PC levels. The GST activity reduction was related to increased PC levels. This finding indicates that enzyme activity might have been affected by protein damage. Consistent with these results, *Oncorhynchus mykiss* exposed for 21 d to IMI and *A. jacuhiensis* exposed to PRO for 96 h presented AChE activity inhibition (Topal et al. 2017; Gonçalves et al. 2018). In this work, all exposure groups presented reduced AChE activity. The inhibition of this enzyme results in the accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft and, consequently, behavioral and physiological alterations (Lushchak 2011). These changes can decrease fish ability to search for food, avoid predators, and look for breeding sites. Furthermore, in zebrafish, early exposure to IMI causes anxiogenic effects that persist in adolescence and adulthood (Crosby et al. 2015).

The most changes in muscle were mediated by the Mix treatment. The muscle presented some adaptations in the antioxidant system in an attempt to reduce the harmful effects of ROS generation; it was partially efficient for PC but not for TBARS levels. Unlike the brain, the muscle showed no AChE activity inhibition, possibly because there are fewer nicotinic receptors (related to IMI) and lower AChE activity compared to brain tissue (Iturburu et al. 2017). Nevertheless, the redox imbalance in this tissue evidenced the presence of the insecticides that were transported from the water through blood flow.

Fish are exposed to a myriad of compounds at different concentrations in their environment (Loro et al. 2015, do Amaral et al. 2018, Severo et al. 2020). Thus, studies that employ isolated and high concentrations are inconsistent with the reality of the aquatic ecosystems. Although it is very difficult to simulate environmental interactions under laboratory conditions, investigations of the interaction of pesticides as well as using low concentrations must be considered and utilized to improve risk assessment knowledge (Wang et al. 2016). Furthermore, the use of native species in studies to evaluate the complexity of pesticide mixtures is extremely important (Furley et al. 2017).

5 CONCLUSIONS

The exposure of *R. quelen* to a mixture of IMI and PRO at environmentally relevant concentrations inhibited AChE activity in the brain and promoted redox imbalance in all sampled tissues. These alterations led to oxidative damage of lipids and proteins. The MIX treatment enhanced the damage effects in relation to isolated pesticides in some biomarkers, possible an additive effect in ROS content, TBARS levels and CAT activity in muscle, and in AChE activity in the brain. Although the co-exposure to IMI and PRO did not induce an additive or synergistic effect in all analyzed biomarkers, alterations could still be observed. However, more studies are required to better determine the additive effects of IMI and PRO mixture, as well as the environmental consequences of these damage effects.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. Vania Lucia Loro received a

research fellowship from CNPq (National Research Council), Process number: 309314/2017-8. Aline Teixeira Marins received a doctoral fellowship from CAPES.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Monografias de agrotóxicos: Imidacloprido. Available in: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/I13+%E2%80%93+Imidacloprido/9d08c7e5-8979-4ee9-b76c-1092899514d7>, accessed December 16, 2019

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Monografias de agrotóxicos: Propoxur. Available in: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/p19.pdf/98a847cd-0eee-483d-b7ea-2dfbd382365f>, accessed December 16, 2019

Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 13: 637–648.

Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat JM (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ*, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>

Baldissera MD, Souza CF, Golombieski JI, Seben D, Sippert LR, Salbego J, Marchesan E, Zanella R, Baldisserotto B (2018a) Purinergic signaling as potential target of thiamethoxam-induced neurotoxicity using silver catfish (*Rhamdia quelen*) as experimental model. *Mol Cell Biochem*, <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3340-x>

Baldissera MD, Souza CF, Seben D, Sippert LR, Salbego J, Marchesan E, Zanella R, Baldisserotto B, Golombieski JI, (2018b) Gill bioenergetics dysfunction and oxidative damage induced by thiamethoxam exposure as relevant toxicological mechanisms in freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. *Sci Total Environ*, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.292>

Baldisserotto B (2009) Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*, 39(1): 291-299. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000046>

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Brauner EV, Raaschou-Nielsen O, Gaudreau E, Leblanc A, Tjønneland A, Overvad K, Sørensen M (2012) Predictors of adipose tissue concentrations of organochlorine pesticides in a general Danish population. *J Expo Sci Env Epid*, 22: 52-59. <https://doi.org/10.1038/jes.2011.39>

Crosby EB, Bailey JM, Oliveri AN, Levin ED (2015) Neurobehavioral Impairments Caused by Developmental Imidacloprid Exposure in Zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*, 49: 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.04.006>

Cunha MA, Zeppenfeld CC, Garcia LO, Loro VL, Fonseca MB, Emanuelli T, Veeck, APL, Copattu CE, Baldisserotto B (2010) Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*. 40(10): 2107-2114.

do Amaral AMB, Gomes JLC, Weimer GH, Marins AT, Loro VL, Zanella R (2018) Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir, *Chemosphere*, 191: 876-885.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.114>

Donato FF, Martins ML, Munaretto JS, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R (2015) Development of a multiresidue method for pesticide analysis in drinking water by solid phase extraction and determination by gas and liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Brazil Chem Soc*, <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150192>

Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Method Enzymol*, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I)

Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95.

Food and Agricultural Organization of the United Nations – FAO (2006) Specifications And Evaluations For Agricultural Pesticides: Propoxur. Available in:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/propoxur.pdf, accessed December 16, 2019

Frew JA, Brown JT, Fitzsimmons PN, Hoffman AD, Sadilek M, Grue CE, Nichols JW (2018) Toxicokinetics of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys C*, 205: 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.01.002>

Furley TH, Brodeur J, Assis HCS, Carriquiriborde P, Chagas KR, Corrales J, Denadai M, Fuchs J, Mascarenhas R, Miglioranza KS, Caramés DMM, Navas JM, Nugegoda D, Planes E, Rodriguez-Jorquera IA, Crozco-Medina M, Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW (2017) Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. *Integr Environ Assess Manag*, <https://doi.org/10.1002/ieam.2023>

Ge W, Yan S, Wang J, Zhu L, Chen A, Wang J (2015) Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *J Agric Food Chem*, 63(6): 1856-1862.
<https://doi.org/10.1021/jf504895h>

Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nadal M, van der Ploeg M, van de Zee SEATM, Ritsema CJ (2015) Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int Soil Water Conserv Res*, 3: 57-65.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>

Gibbons D, Morrissey C, Mineau P (2014) A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut R*, <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>

- Gonçalves CR, Marins AT, do Amaral AMB, Leitemperger J, Severo ES, Moraes BS, Zanella R, Loro VL (2018) Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. *B Environ Contam Tox*, 100(4): 524-528. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2285-9>
- Gül A, Benli ÇK, Ayhan A, Memmi BK, Selvi M, Sepici-Dinçel A, Çakirogullari GÇ, Erkoç F (2012) Sublethal propoxur toxicity to juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758): biochemical, hematological, histopathological, and genotoxicity effects. *Environ Toxicol Chem*, 31(9): 2085-2092. <https://doi.org/10.1002/etc.1924>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249 (22): 7130-7139.
- Hanson R, Dodoo DK, Essumang DK, Blay Jr J, Yankson K (2007) The Effect of some Selected Pesticides on the Growth and Reproduction of Fresh Water *Oreochromis niloticus*, *Chrysiethys nigrodigitatus* and *Clarias gariepinus*. *B Environ Contam Tox*, 79(5): 544-547. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9279-3>
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais – IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos, boletim 2018. Available in: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>, accessed December 16, 2019
- International Union for Conservation of Nature – IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. Available in: <https://www.iucnredlist.org/search/stats?query=rhamdia%20quelen&searchType=species>, accessed December 16, 2019
- Iturburu FG, Simoniello MF, Medici S, Panzeri AM, Menone ML (2018) Imidacloprid Causes DNA Damage in Fish: Clastogenesis as a Mechanism of Genotoxicity. *B Environ Contam Tox*, 100: 760-764. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2338-0>
- Iturburu FG, Zömisich M, Panzeri AM, Crupkin AC, Contardo-Jara V, Pflugmacher S, Menone ML (2017) Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ Toxicol Chem*, 9999: 1-10. <https://doi.org/10.1002/etc.3574>
- Loro VL, Murussi C, Menezes C, Leitemperger J, Severo E, Guerra L, Costa M, Perazzo GX, Zanella R (2015) Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop Ichthyol*, 13(3): 569-578. <https://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20140146>
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*, 101: 13-30. Doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Marins AT, Rodrigues CCR, de Menezes CC, Gomes JLC, Costa MD, Nunes MEM, Vieira MS, Donato FF, Zanella R, da Silva LP, Loro VL (2018) Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. *Ecotox Environ Safe*, 151: 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.021>

- Menezes C, Leitemperger J, Murussi C, Vieira MS, Adaime MB, Zanella R, Loro VL (2016) Effect of diphenyl diselenide diet supplementation on oxidative stress biomarkers in two species of freshwater fish exposed to the insecticide fipronil. *Fish Physiol Biochem*, <http://doi.org/10.1007/s10695-016-0223-5>
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247 (10): 3170-3175.
- Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4)
- Nunes MEM, Müller TE, Braga MM, Fontana BD, Quadros VA, Marins A, Rodrigues C, Menezes C, Rosemberg DB, Loro VL (2016) Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. *Mol Neurobiol*, 54(6): 3925-3934. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9919-x>
- Oliveira FA, Reis LPG, Soto-Blanco B, Melo MM (2015) Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *J Environ Sci Heal B*, 50(6): 398-405. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011946>
- Pandey MR, Guo H (2014) Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos. *Toxicol in Vitro*, 28: 340-353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.010>
- Severo ES, Marins AT, Cerezer C, Costa D, Nunes M, Prestes OD, Zanella R, Loro VL (2020) Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. *Ecotox Environ Safe*, 190:110071. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110071>
- Sposito JCV, Montagner CC, Casado M, Navarro-Martín L, Solórzano JCJ, Piña B, Grisolia AB (2018) Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 209: 696-704. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.046>
- Topal A, Alak G, Ozkaraca M, Yeltekin AC, Comakli S, Acil G, Kokturk M, Atamanalp M (2017) Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 175: 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.047>
- Torres CA, Capuli EE (2019) *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Available in: <http://www.fishbase.org/summary/Rhamdia-quelen.html>, accessed December 16, 2019
- United States Environmental Protection Agency – USEPA (1997) Reregistration Eligibility Decision, Propoxur List B, Case 2555. Available in:

<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/2555red.pdf>, accessed December 16, 2019

Vieira CED, Pérez MR, Acayaba RD, Raimundo CCM, Martínez CBR (2018) DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195: 125-134.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.077>

Wang Y, Yang G, Dai D, Xu Z, Cai L, Wang Q, Yu Y (2016) Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environ Sci Pollut R*, 24(5): 4528-4536. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8205-9>

World Health Organisation – WHO (2003) FAO/WHO Evaluation Report 80/2003 in WHO specifications and evaluations for public health pesticides: Propoxur, 2-isopropoxyphenyl methylcarbamate. Available in:
https://www.who.int/whopes/quality/Propoxur_eval_specs_WHO_August_2017.pdf?ua=1, accessed December 16, 2019

Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human Low-density lipoproteins. *Anal Biochem*, 228: 349-351.

TABLES**Table 1.** Imidacloprid and propoxur water chromatographic determination by LC-MS/MS

	Nominal concentration ($\mu\text{g/L}$)	IMI		PRO		Mix	
		<i>0 h</i>	<i>96 h</i>	<i>0 h</i>	<i>96 h</i>	<i>0 h</i>	<i>96 h</i>
Imidacloprid ($\mu\text{g/L}$)	0.11	0.129	0.104			0.106	0.103
Propoxur ($\mu\text{g/L}$)	0.039			0.042	0.024	0.039	0.024

Limit of detection: 0.006 $\mu\text{g/L}$. Limit of quantification: 0.020 $\mu\text{g/L}$.

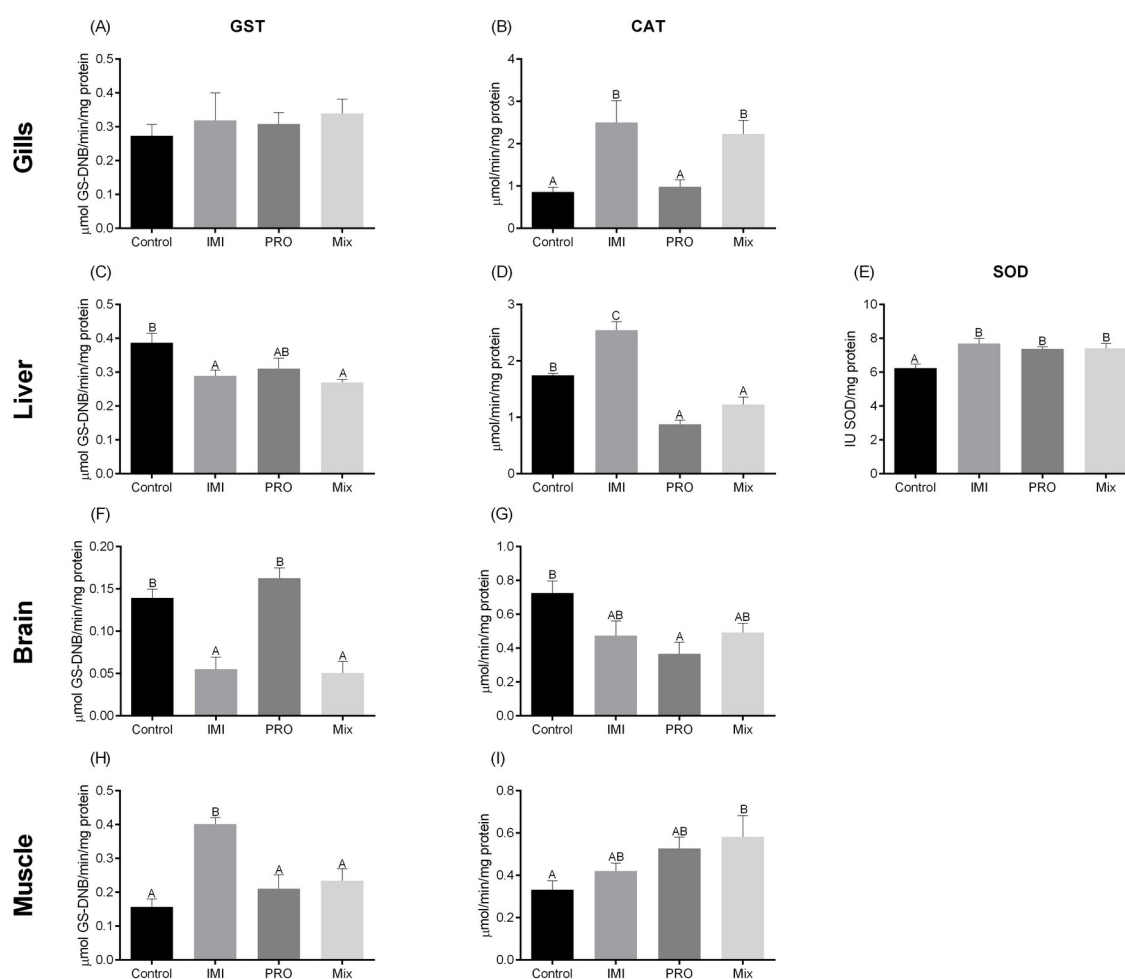
Table 2. TBARS levels and protein carbonyl content in the gills, liver, brain, and muscle of *Rhamdia quelen* exposed to imidacloprid and propoxur

TBARS				
	<i>Gills</i>	<i>Liver</i>	<i>Brain</i>	<i>Muscle</i>
Control	2.735 ± 0.059 ^A	4.652 ± 0.162 ^B	5.306 ± 0.202 ^B	1.379 ± 0.034 ^A
IMI	3.665 ± 0.263 ^B	1.065 ± 0.019 ^A	5.454 ± 0.359 ^B	1.348 ± 0.023 ^A
PRO	2.728 ± 0.102 ^A	1.255 ± 0.023 ^A	2.817 ± 0.182 ^A	1.338 ± 0.023 ^A
Mix	2.772 ± 0.035 ^A	1.180 ± 0.018 ^A	2.998 ± 0.108 ^A	1.745 ± 0.110 ^B
Protein carbonyl				
	<i>Gills</i>	<i>Liver</i>	<i>Brain</i>	<i>Muscle</i>
Control	8.490 ± 0.259 ^B	5.816 ± 0.387 ^A	6.977 ± 0.222 ^A	5.257 ± 0.138 ^B
IMI	7.572 ± 0.654 ^B	6.235 ± 0.332 ^A	12.030 ± 0.784 ^B	4.310 ± 0.229 ^A
PRO	5.908 ± 0.297 ^A	9.520 ± 0.210 ^B	7.794 ± 0.572 ^A	5.308 ± 0.219 ^B
Mix	7.117 ± 0.277 ^{AB}	9.035 ± 0.370 ^B	10.070 ± 0.137 ^B	4.259 ± 0.195 ^A

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). TBARS levels are expressed as nmol TBARS/mg protein. Protein carbonyl content are expressed as nmol carbonyl/mg protein.

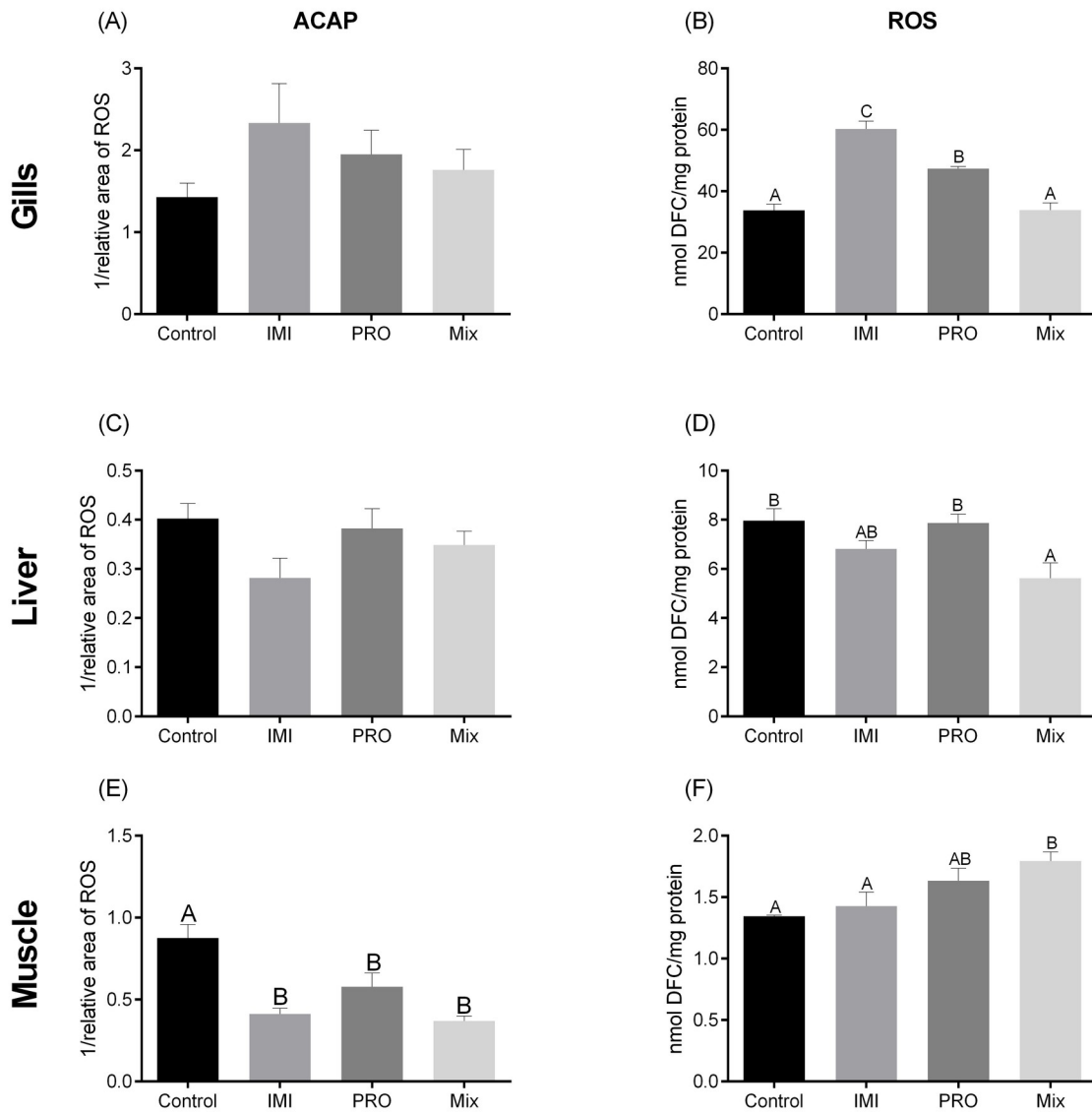
FIGURES

Fig. 1. Glutathione S-transferase (GST) activity in the gills (A), liver (C), brain (F), and muscle (H), catalase (CAT) activity in the gills (B), liver (D), brain (G), and muscle (I), and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver (E) of *Rhamdia quelen* exposed to imidacloprid and propoxur



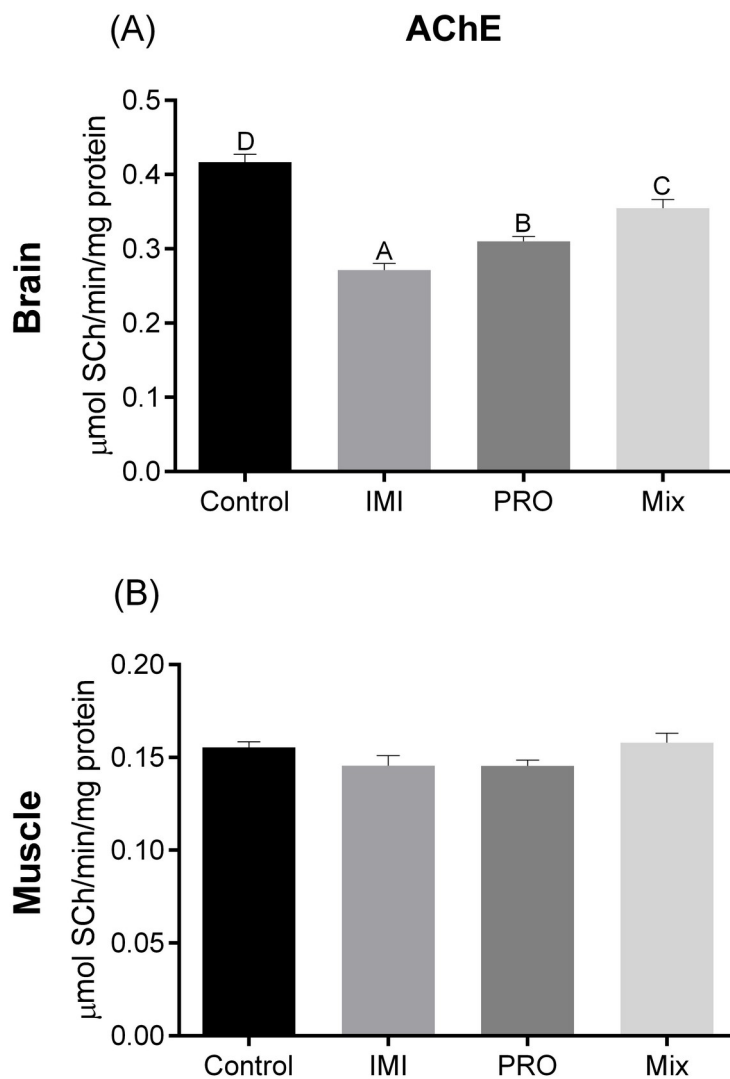
The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Different letters indicate differences among groups.

Fig. 2. The antioxidant capacity against peroxides (ACAP) in the gills (A), liver (C), and muscle (E), and reactive oxygen species (ROS) levels in the gills (B), liver (D), and muscle (F) of *Rhamdia quelen* exposed to imidacloprid and propoxur



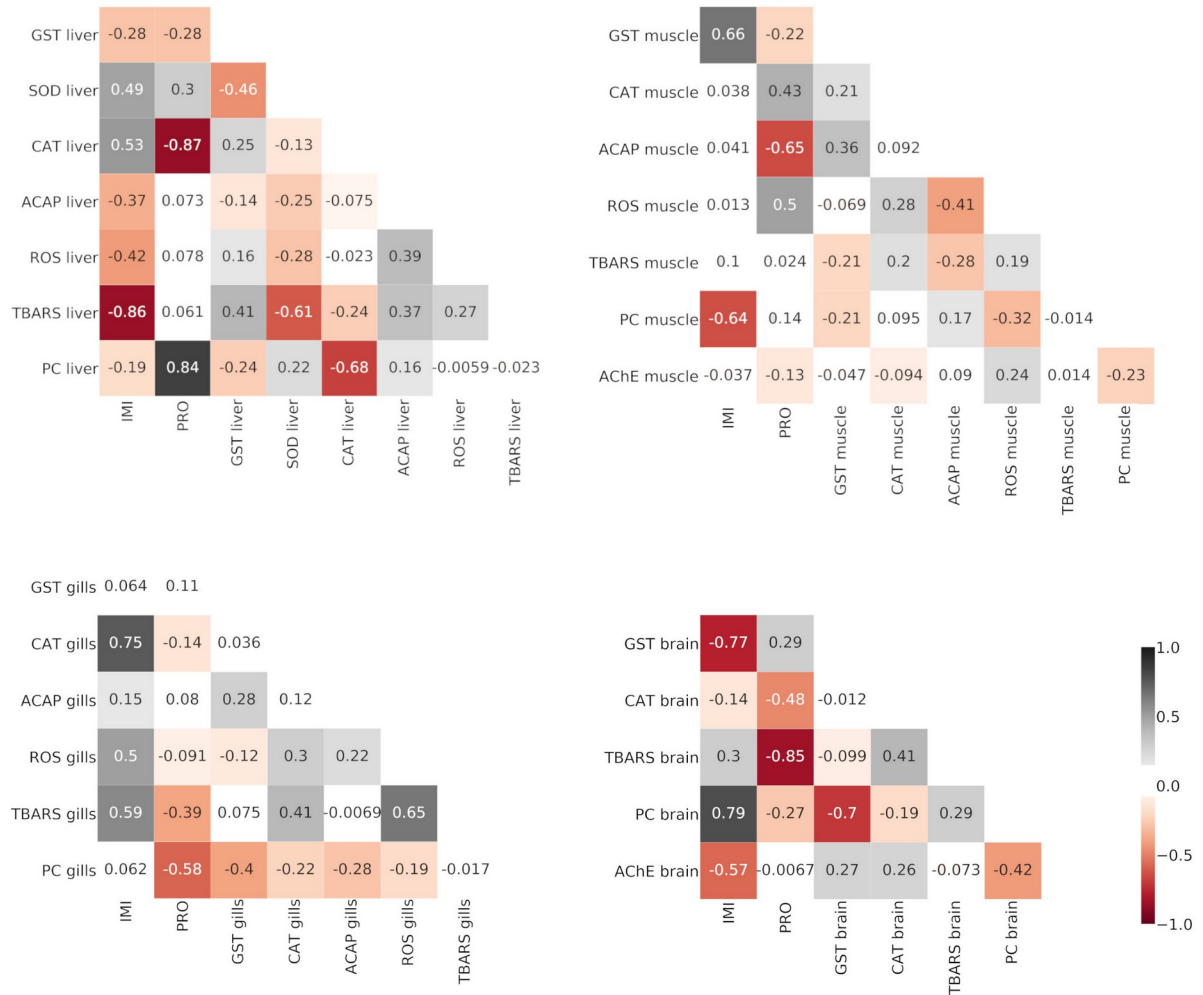
The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Different letters indicate differences among groups.

Fig. 3. Acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain (A) and muscle (B) of *Rhamdia quelen* exposed to imidacloprid and propoxur



The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Different letters indicate differences among groups.

Fig. 4. A heatmap of the Spearman correlation matrix of *Rhamdia quelen* exposed to imidacloprid and propoxur



Red and grey colors indicate negative and positive correlations, respectively.

7 MANUSCRITO 3

Assessment of river water quality in an agricultural region of Brazil using biomarkers in a native neotropical fish, *Astyanax* spp. (Characidae)

Aline Teixeira Marins^{ac}, Eduardo Stringini Severo^{ac}, Jossiele Wesz Leitemperger^{bc}, Cristina Cerezer^{ac}, Talise Elwanger Muller^b, Maiara Dorneles Costa^c, Gustavo Henrique Weimer^c, Nelson Miguel Grubel Bandeira^d, Osmar Damian Prestes^d, Renato Zanella^d, Vania Lucia Loro^{abc*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

^cLaboratório de Toxicologia Aquática (Labtaq).

^dLaboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), Universidade Federal de Santa Maria

* Corresponding author at

Professor Vania L. Loro, PhD,
Roraima Avenue, Santa Maria, RS,
CEP: 97105–900, Brazil,
telephone: +55 55 3220-9456,
email: vania.loro@gmail.com

Manuscrito publicado no periódico *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*

Doi: <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02821-0>

ABSTRACT

Intensive agricultural and livestock activities demand high pesticide use and, consequently, contaminants reach aquatic ecosystems. In the lower Jacuí River, southern Brazil, there is a lack of knowledge about pesticide residues in water samples and the biochemical responses in native fish species. Thus, this study aimed to estimate the influence of pesticide residues and water parameters to biomarker responses in the native fish *Astyanax* spp. We performed seasonal biomonitoring in 2017 with water samples and fish collections. Biomarkers of oxidative stress, antioxidants, biotransformation, and neurotoxicity were analyzed in fish tissues. Fourteen pesticide residues were detected; they presented correlations with detoxification enzyme and oxidative stress biomarkers. These data indicate that most of variations can be related to the pesticide presence in water indicating high aquatic pollution in this place.

KEYWORDS: Bioindicator. Biomarkers. Biomonitoring. Fish. Pesticides.

1 INTRODUCTION

The current agricultural production model needs the use of chemical defenses, called pesticides. In Brazil, 2017 registered sales of 487,591 tons of active ingredient (IBAMA 2019). Pesticides are dispersed throughout the environment through drift, leaching, or soil erosion. These toxic compounds can reach water resources; they are detected in surface water and sediment during monitoring programs, wherein a wide variety of compounds as well as variable concentration distribution can be measured (Loro et al. 2015; Etchegoyen et al. 2017; Deknock et al. 2019). Non-target organisms, including fish, amphibians, mollusks, crustaceans, diatoms, and biofilms, may absorb and respond to these toxic compounds in myriad ways, depending on the physicochemical characteristics of the compound, the source, and the individual susceptibility of the species, namely trophic level, age, and sex (when applicable). Those organisms that respond to these pollutants can present endocrine disruption, histopathology, reproductive inhibition, behavioral alterations, and bioaccumulation (Prado et al. 2014; Wood et al. 2016; Yamamoto et al. 2017; Miller et al. 2019; Rooney et al. 2019; Zhang et al. 2019). Furthermore, changes in community composition affect ecosystem and alter for example microalgae and macroinvertebrates exposed to pesticides (Wood et al. 2016; Bashnin et al. 2019). Additionally, many pesticides can trigger oxidative stress through the reactive oxygen species (ROS) generation and consequently cause damage to biomolecules such as nucleic acids, membrane lipids, and proteins (Lushchak 2011). These changes can be measured in different organs through biochemical biomarkers, including lipid peroxidation levels, protein carbonyl levels, and antioxidant enzyme activity (e.g., peroxidase activity). Furthermore, some pesticides of different class as OP's or Carbamates can inhibit/induce acetylcholinesterase (AChE) activity and cause neurotoxic effects even in vertebrates as fish (Modesto and Martinez, 2010; Lushchak 2011; Sakuragui et al. 2013; Murussi et al., 2015; Gonçalves et al. 2018; Nunes et al. 2018). Biomarkers are important parameters (or measures) that improve and complement freshwater monitoring results, especially given that water quality parameters may underestimate the biotic response to organic pollutants (Ghisi et al. 2017). Fish collected in lotic ecosystems, exposed in situ in reservoirs or under laboratory conditions to effluents (or toxics), present alterations in biomarkers, genetic damage, and biochemical adjustments (Loro et al. 2015; dos Santos et al. 2016; Bianchi et al 2018; Francisco et al. 2019). These organisms

are sensitive to very low concentrations of miscellaneous compounds. Physicochemical freshwater parameters alone may not fully evidence the real risk of aquatic organisms to emergent pollutants (Furley et al. 2017). Thus, the use of native fish species improves knowledge about the interference of aquatic pollution because these organisms are under chronic exposure to it and can reliably express what happens in the environment compared to laboratory toxicological tests. The use of native fish of the *Astyanax* genus (Teleostei: Characidae) in studies of environmental quality has gained attention in Brazil due to their feeding habits (omnivorous, which may indicate alterations at different trophic levels), wide geographical distribution, and realistic response to pollutants. These features make them attractive and useful bioindicators in ecological risk assessment (Vieira et al. 2014; Costa-Silva et al. 2015; Ghisi et al. 2017; Francisco et al. 2019). Some environmental pollution assessments used *Astyanax* spp. as bioindicators of reproductive disruption, genotoxicity, antioxidant enzymes inhibition, and oxidative damage (de Lemos et al. 2008; Prado et al. 2011, 2014; Sakuragui et al. 2013; Loro et al. 2015). Collectively, the data evidence that this species is a great tool to evaluate the effects of chemicals on the health of the animals and environment.

Located in southern Brazil, the Lower Jacuí River basin corresponds to an area of 17,427 km². It is the water source for 40 cities with more than 775.000 inhabitants (SEMA/DRH 2012; IBGE 2019). This region has two important biomes: the Pampa and the Atlantic Forest. However, it is characterized by intensive agricultural and livestock activities that account for 68.53% of land use, and only 24.22% of native forest cover remains (SEMA/DRH 2015). Some systems of production, such as forestry, temporary crops, and permanent crops, require the use of different pesticides throughout the year. The Rio Grande do Sul State registered a sale of 63,697 tons of active ingredient in just 2017, as carbamates, glyphosate-based herbicides, OP, triazine, triazole, and others (IBAMA 2019). These data are very worrying in terms of public health.

Water pesticide residue monitoring and biomarker analysis in native fish species caught in freshwater resources are major issues of research concern in Latin America (Furley et al. 2017). Furthermore, there is a lack of information about the water quality status in agricultural regions of the Pampa biome and southern Atlantic Forest. Considering that the Lower Jacuí River Basin has endemic fish and aquatic invertebrate species—some of which are endangered (ICMBio/MMA 2018)—and the economic role of this water source for the

region, the research for information on the impacts of pesticides on animal bioindicators is crucial. Some regions in the south of the country generally use monoculture practices for various reasons including economic, so it is possible that monoculture could influence the amount of pesticides that arrive in rivers. In line with this, the goal of this study was to estimate the influence of pesticide residues and water parameters to biomarkers responses in the native fish *Astyanax* spp. We intended also to improve the knowledge about pesticide induced responses in freshwater fish.

2 METHODS AND MATERIALS

The study was conducted at three sites in the Lower Jacuí River basin, Cachoeira do Sul, RS, Brazil. Site 1 (30°00'34.0"S 53°00'53.7"W) and site 2 (30°04'53.6"S 52°53'56.0"W) are located in a rural region, near to field crops. Site 3 (30°03'13.9"S 52°52'57.1"W) is located in the urban area; it receives urban effluent as well as water from agricultural areas. It was not possible to select a reference site as a control because the lower Jacuí river basin is all inserted in an agricultural region, with significant cultivation of corn, soy, rice and pasture (SEMA/DRH 2015). The samplings were performed in the summer (January 2017), autumn (May 2017), winter (August and September 2017), and spring (November 2017). The study was approved by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), under registration number 56273-2.

Samples of surface water and sediment were collected at sampling sites and forwarded under refrigeration to the Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). In the laboratory, a total of 80 active principles (pesticides) were evaluated in the samples by gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS and LC-MS/MS), following methodologies described by Donato et al. (2015) and Martins et al. (2014), respectively. These pesticides were selected based on LARP analysis standards, and region uses. A multiparameter water quality equipment (Horiba® U-52 probe) determined the temperature (°C), pH, electric conductivity (mS.cm⁻¹), turbidity (NTU), dissolved oxygen (mg.L⁻¹), and total dissolved solids (g.L⁻¹). The levels of total ammonia (NH₄⁺ μmol.L⁻¹) and nitrite (NO₂⁻ mg.L⁻¹) were determined in superficial water samples (Verdouw et al. 1978).

Using a fishing rod, a total of 44 specimens of *Astyanax fasciatus* and 49 specimens of *Astyanax jacuhiensis* were captured, a mean of eleven fish of each species for sampling period. After collection, the fish were anesthetized by immersion in a clove oil solution, and the total length (TL) and body weight (BW) were recorded. The body weight and total length of both fish species were: 30.7 ± 22.4 g and 11.5 ± 4.2 cm. Subsequently, the fish were euthanized by spinal cord transection. The specimens were kept under refrigeration and routed to Laboratório de Toxicologia Aquática (Labtaq) at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Brain, gills, liver, and muscle were removed and stored at -80 °C for later analysis. The condition factor (CF) was calculated following Baldisserotto (2013) by the formula $CF = \text{body weight}/\text{total length}^3$. Brain, gills, liver, and muscle were homogenized with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer (in a 1:20 ratio of tissue to buffer). The homogenates were centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatant was used for biochemical analysis. The protein content was determined as described by Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard, and expressed as $\text{mg protein.mL}^{-1}$. The lipid peroxidation (LPO) levels, hydrogen peroxide (H_2O_2), reactive oxygen species (ROS) content, glutathione S-transferase (GST) activity, and antioxidant capacity against peroxides (ACAP) were determined in gills and liver. The LPO levels were estimated using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, according to Draper and Hadley (1990), and expressed as $\text{nmol of MDA.mg protein}^{-1}$. The H_2O_2 content was determined according to Velikova et al. (2000) and expressed as $\mu\text{mol.mg protein}^{-1}$. The ROS content was determined by Ali et al. (1992), using the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) to the fluorescent dichlorofluorescein (DCF) as a ROS marker. The ROS content is expressed as $\text{nmol DFC.mg protein}^{-1}$. GST activity was assayed according to Habig et al. (1974), using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate, and expressed as $\mu\text{mol GS-DNB.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$. ACAP was determined according to the methodology described by Amado et al. (2009) and expressed as 1.relative area of ROS^{-1} . Acetylcholinesterase activity (AChE) was determined in brain and muscle, according to Ellman et al. (1961), and expressed as $\mu\text{mol SCh hydrolyzed.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

Results of both species were grouped, considering that presented similar results and belong to the same genus. Normal distribution of data were verified using Shapiro–Wilk test. Due to seasonal variation the data were considered non-parametric, thus we performed a Spearman correlation analysis among biomarkers and abiotic parameters. The statistical

analysis was performed with Seaborn (v0.9.0), a Python data visualization library based on matplotlib. For pesticide residues with concentrations that were lower than the limit of quantification (LOQ) and higher than the limit of detection (LOD), we utilized values of the mean between LOQ and LOD. The pesticides atrazine, 2,4-D, carbendazim, fipronil, quinclorac, and tebuconazole were not utilized in the matrix calculation because they were not analyzed in all collections. Pesticides which were not detected were not used in the statistical analysis. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first to perform biomonitoring using native freshwater fish in this course of the Jacuí River. We verified a wide variety of pesticide residues in the water samples, and most of them correlated with the biomarkers analyzed in the fish (Figure 1).

The measured physicochemical parameters of river water values were in accordance with Brazilian legislation (CONAMA 2005), based on class 2 of water body classification (water intended for human supply after conventional treatment and for the protection of aquatic communities; Supplementary materials, Table S1). Interestingly, although no pesticides were detected in sediment (data not shown), 14 pesticides were found in water samples (Supplementary materials, Table S2). Only two of these compounds have a legal established limit in Brazil ($2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for atrazine and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 2,4-D), and the samples were below the established limits for class 2 freshwater. Previous studies reported the detection of pesticide residues in water samples, namely Brazilian rivers (Loro et al. 2015; do Amaral et al. 2018; Sposito et al. 2018; Vieira et al. 2019) and water from other countries (Etchegoyen et al. 2017; Nowell et al. 2017; Deknock et al. 2019; Espel et al. 2019). Importantly, in another study from our group performed in this same region, 11 out of 14 compounds were detected in superficial water samples: atrazine, azoxystrobin, bentazon, epoziconazole, fipronil, imidacloprid, propiconazole, quinclorac, tebuconazole, tetraconazole, and trifloxystrobin. These pesticides are applied to corn, rice, soy, and wheat. There are important products in the region, and their detection implies a trend in application of these compounds in the field crops (Marins et al. unpublished data). Although the water pesticide residues presented concentrations at $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels in the current study, we emphasize our concern about

the chronic exposure to which aquatic organisms are subjected. We also warn about the human risk from fish consumption because many of these compounds are bioaccumulative in the trophic web, as verified in the fish *Prochilodus costatus* caught in the São Francisco River (Oliveira et al. 2015), in the fish *Prochilodus lineatus* exposed *in situ* in a lentic environment near field crops in southern Brazil (Vieira et al. 2019), and in the amphipod crustacean *Gammarus pulex* collected in rivers from Suffolk, UK (Miller et al. 2019). Furthermore, the intake of fatty-fish was positively associated with the accumulation of lipid-soluble pesticides in adipose tissue samples of a Danish population (Bräuner et al. 2012).

The monitoring using chemical parameters did not identify a real risk to the aquatic environment in this study according to data obtained in Brazilian legislation (CONAMA 2005). However, analysis of biomarkers in resident organisms of the Jacuí River can alert to possible adverse effects of pollutants that reached the water. As there are no industries associated with this stretch of the river, one of the main sources of pollution possibly is from agriculture, due to the pesticides applied to crops near this hydrographic basin and through the invasion of permanent protection areas (such as riparian forest) by pasture and fieldcrops (SEMA/DRH 2015). Another source of pollution is sewage effluents from urban areas, e.g., in Cachoeira do Sul city only 32.1% of all sewage generated is treated (SNIS 2020). However, <1% of the surface water demand in the lower Jacuí river basin is intended for population supply, and 96.6% of the total basin demand is for irrigation purposes (SEMA/DRH 2015). In this way, the agricultural activity in the region is a potential polluter, needing investigation of impacts in native organisms. In this work, GST, TBARS, and ROS were correlated with the environmental parameters. GST is a phase II detoxification enzyme, present in serious toxicological studies, that represents the organism's reaction to diverse xenobiotics (dos Santos et al. 2016; do Amaral et al. 2018; Gonçalves et al. 2018). TBARS levels and ROS content are biomarkers of oxidative damage and can signal exposure to toxic compounds that can generate ROS (Lushchak 2011; Nunes et al. 2018). Our results are consistent with dos Santos et al. (2016) and emphasize that morphological and biochemical biomarkers are efficient measures of environmental disturbance that deserve attention regarding their use in water resources monitoring. Indeed, they are sensitive indicators of chemical exposure.

We verified some expected correlations among water quality parameters and the biomarkers given the limited variations among seasons (Fig. 1). Temperature showed a moderate positive relationship with gills GST activity and ROS content in liver. Changes in

water temperature can evidence the seasonal alteration in other factors, including metabolic and hormonal changes in the organisms that respond to environment variation provoked by seasonality, the increase or scarcity of food sources, reproductive issues, and the temperature itself that can cause stress in fish (Lushchak 2011; Loro et al. 2015; Ghisi et al. 2017). The pH had a moderate negative correlation with ROS content in liver. The water pH can be affected by soil composition; it also has an inverse relationship with phytoplankton photosynthesis rate. The change in water pH triggers a series of adaptations in fish in order to maintain their ionic balance, a phenomenon that may interfere with their ability to survive (Baldisserotto 2013). Total ammonia was highly positively correlated with GST activity in liver and a moderately positive relationship with gills GST activity. Nitrite exhibited a moderately negative correlation with TBARS levels in liver and a highly negative relationship with TBARS levels in gills. Livestock is an important source of organic matter, nitrogen and phosphorus for the Jacuí basin, and urban sewage is considered an insignificant source (SEMA/DRH 2015). Furthermore, some fertilizers applied to agricultural land can leach into the rivers through runoff. This process leads to excessive nutrients in the water, like nitrogen, which can increase ammonia and nitrite levels during some seasons. This input suggests other chemical compounds in addition to pesticides may potentially enter the freshwater and cause oxidative damage in fish species for example.

From the pesticides used in the correlation analysis, the fungicides showed similar results. Indeed, most of them were detected in the water samples during the same season (Fig. 1). Epoxiconazole, propiconazole, and trifloxystrobin showed moderately positive correlations with liver GST activity and ROS content in gills and a highly negative correlation with ROS content in liver. Additionally, tetraconazole showed a moderately negative correlation with ROS content in liver. On the other hand, azoxystrobin had a moderately positive correlation with TBARS levels in gills. Metconazole was not correlated with any biomarkers. The increase in liver GST activity may be a response to the presence of xenobiotics, specifically an attempt to eliminate them from the organism by making them more hydrophilic and easier to excrete. Hence, the decrease in oxidative stress biomarkers in that tissue may represent increased detoxification and antioxidant system, as reported by Loro et al. (2015). On the other hand, the positive relationship of the fungicides with the ROS content and TBARS levels in gills indicates an oxidative disturbance, since this tissue is the first to contact the chemical compounds present in the water. The oxidative damage in the

gills could impair important physiology processes in the tissue, including osmoregulation, gas exchange, and excretion, and decrease the fitness of the fish (Baldisserotto 2013; dos Santos et al. 2016). The fungicides' statistical results could be an interaction of factors. Since winter presented more variety of fungicides, the interaction of pesticides (most of them the same chemical group) with abiotic factors could be an interference to interpretation of the data. Further laboratory toxicological exposures are required to prove a cause-effect relationship and could generate biomarkers of exposure to specific pesticide classes.

From the four herbicides detected in water samples, only bentazon was used in the correlation analysis: It showed a moderately positive relationship with gills GST activity and ROS content in liver (Fig. 1). Although GST responses are related to compound detoxification, we observed that the possibility to generate reactive species was superior to the antioxidant capacity of the tissue. Furthermore, for the two detected insecticides, imidacloprid was utilized in the statistical analysis. It demonstrated a moderately positive correlation with ROS content in liver and a moderately negative correlation with ROS content in gills (Fig. 1). In another study of our group, *Rhamdia quelen* was exposed to imidacloprid at environmental concentration for 96 h, and inverse results were observed (Marins et al. unpublished data). These results possibly is related with an antioxidant capacity intrinsic to the tissue and the species, or a combination of factors as differences in the distribution of compounds in the tissues, duration of exposure, as well as interaction with others contaminants present in water. The differences in response underscores the necessity to use all tissues in a biomonitoring endeavor, because the alterations may be tissue-specific, as demonstrated by dos Santos et al. (2016).

In this study, liver samples, which showed greater changes compared to other tissues, can be considered a relatively sensitive tissue. The ROS content in liver was the biomarker with the highest number of correlations with the abiotic variables, mainly pesticides. Few water parameters were correlated with biomarkers. These data demonstrated that most of the variations may be related to the pesticide presence in water. This possibility raises concerns about decreasing water quality in the freshwater ecosystems, mainly by agriculture-derived products that can induce oxidative damage in wild species. This damage can lead to diverse consequences—biomolecule oxidation and histological alterations—that may have ecological consequences (dos Santos et al. 2015; Loro et al. 2015). Furthermore, we emphasize the necessity to implement economic policies that incentivize good agricultural practices to

ensure and safeguard biodiversity. In addition the use of biomarkers in aquatic organisms could be important to verify the possible damage and try improved actions strategies against pollution.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) - Finance Code 001. Vania Lucia Loro received a research fellowship from CNPq (National Research Council), Process number: 309314/2017-8. Aline Teixeira Marins received a doctoral fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors would like to thank Pedro Henrique Pinto Leão, Rudy Beskow, and Renata Teixeira Marins for technical support. Special thanks to the citizens of the Cachoeira do Sul city.

REFERENCES

- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13:637–648.
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB et al (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Baldisserotto B (2013) *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 3rd edn. Ed. da UFSM, Santa Maria, pp 231-233.
- Bashnin TB, Verhaert V, de Jonge M et al (2019) Relationship between pesticide accumulation in transplanted zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and community structure of aquatic macroinvertebrates. *Environ Pollut.* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.140>
- Bianchi E, Dalzochio T, Simões LAR et al (2018) Water quality monitoring of the Sinos River Basin, Southern Brazil, using physicochemical and microbiological analysis and biomarkers in laboratory-exposed fish. *Ecohydrol Hydrobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.05.002>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brauner EV, Raaschou-Nielsen O, Gaudreau E et al. (2012) Predictors of adipose tissue concentrations of organochlorine pesticides in a general Danish population. *J Expo Sci Env Epid.* <https://doi.org/10.1038/jes.2011.39>
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005) Resolução N° 357 de 17 de março de 2005, Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 18 march 2005, 53: 58-63.
- Costa-Silva DG, Nunes MEM, Wallau GL et al (2015) Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. *Environ Sci Pollut R.* <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4737-7>
- de Lemos CT, Iranço F de A, de Oliveira NC et al (2008) Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Sci Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.006>
- Deknock A, de Troyer N, Houbraken M et al (2019) Distribution of agricultural pesticides in the freshwater environment of the Guayas river basin (Ecuador). *Sci Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.185>

Donato FF, Martins ML, Munaretto JS et al (2015) Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. J Braz Chem Soc. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150192>

dos Santos DR, Yamamoto FY, Neto FF et al (2016) The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply—Southern Brazil. Environ Sci Pollut Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>

Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 186: 421-431.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88–95

Espel D, Diepens NJ, Boutron O et al (2019) Dynamics of the seagrass *Zostera noltei* in a shallow Mediterranean lagoon exposed to chemical contamination and other stressors. Estuar Coast Shelf Sci. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.03.019>

Etchegoyen MA, Ronco AE, Almada P. et al. (2017) Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. Environ Monit Assess. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5773-1>

Francisco CM, Bertolino SM, Oliveira Jr. RJ et al (2019) Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. J Toxicol Env Heal A. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1624235>

Furley TH, Brodeur J, de Assis HCS et al (2017) Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. Integr Environ Assess Manag. <https://doi.org/10.1002/ieam.2023>

Gonçalves CR, Marins AT, do Amaral AMB et al (2018) Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. B Environ Contam Tox. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2285-9>

Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249:7130–7139

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2019) – Relatórios de comercialização de agrotóxicos. <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Accessed 11 october 2019

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019) Dados estatísticas do Estado do Rio Grande do Sul. <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/>. Accessed 11 october 2019

ICMBio/MMA – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente (2018) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. <http://www.icmbio.gov.br/portal/component/content/article/10187>. Accessed 12 november 2019

Loro V, Murussi C, Menezes, C et al (2015) Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop Ichthyol*. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140146>

Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

Martins GL, Friggi CA, Prestes OD et al (2014) Simultaneous LC-MS/MS determination of imidazolinone herbicides together with other multiclass pesticide residues in soil. *Clean (Weinh)*. <http://dx.doi.org/10.1002/clen.201300140>

Miller TH, Ng KT, Bury ST et al (2019) Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in a freshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. *Environ Int*. 129: 595-606 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.038>

Modesto KA, Martinez CBR (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibited the acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78: 294-299.

Nunes MEM, Müller TE, Murussi C et al (2018) Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish – A comparative study. *Comp Biochem Phys C*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.002>

Oliveira FA, Reis LPG, Soto-Blanco B et al (2015) Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *J Environ Sci Health B*. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011946>

Prado PS, Pinheiro APB, Bazzoli N et al (2014) Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environ Res*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.002>

Prado PS, Souza CC, Bazzoli N et al (2011) Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotox Environ Safe*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.017>

Rooney RC, Davy C, Gilbert J et al (2019) Periphyton bioconcentrates pesticides downstream of catchment dominated by agricultural land use. *Sci Total Environ*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134472>

Sakuragui MM, Paulino MG, Pereira CS et al (2013) Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ Pollut*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.032>

SEMA/DRH – Secretaria Estadual do Meio Ambiente, Departamento de Recursos Hídricos (2012) Relatório Anual sobre a Situação dos Recursos Hídricos no Estado do Rio Grande do Sul – Ano 2009/2010. Porto Alegre.

SEMA/DRH – Secretaria Estadual do Meio Ambiente, Departamento de Recursos Hídricos (2015) – Relatório final: Planejamento da Bacia Hidrográfica do Baixo Jacuí, Fases “A”, “B” e “C”. Porto Alegre.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (2020) Painel de Indicadores. http://appsnis.mdr.gov.br/acompanhamento/web/agua_esgoto/mapa-esgoto

Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci*. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)

Verdouw H, Van Echteld CJA, Dekkers, EMJ (1978) Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12: 399-402.

Vieira CED, Almeida MdaS, Galindo BA, et al. (2014) Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotrop Ichthyol*. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252014000100017>

Vieira CED, Costa PG, Caldas SS et al (2019) An integrated approach in subtropical agroecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. *Sci Total Environ*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.209>

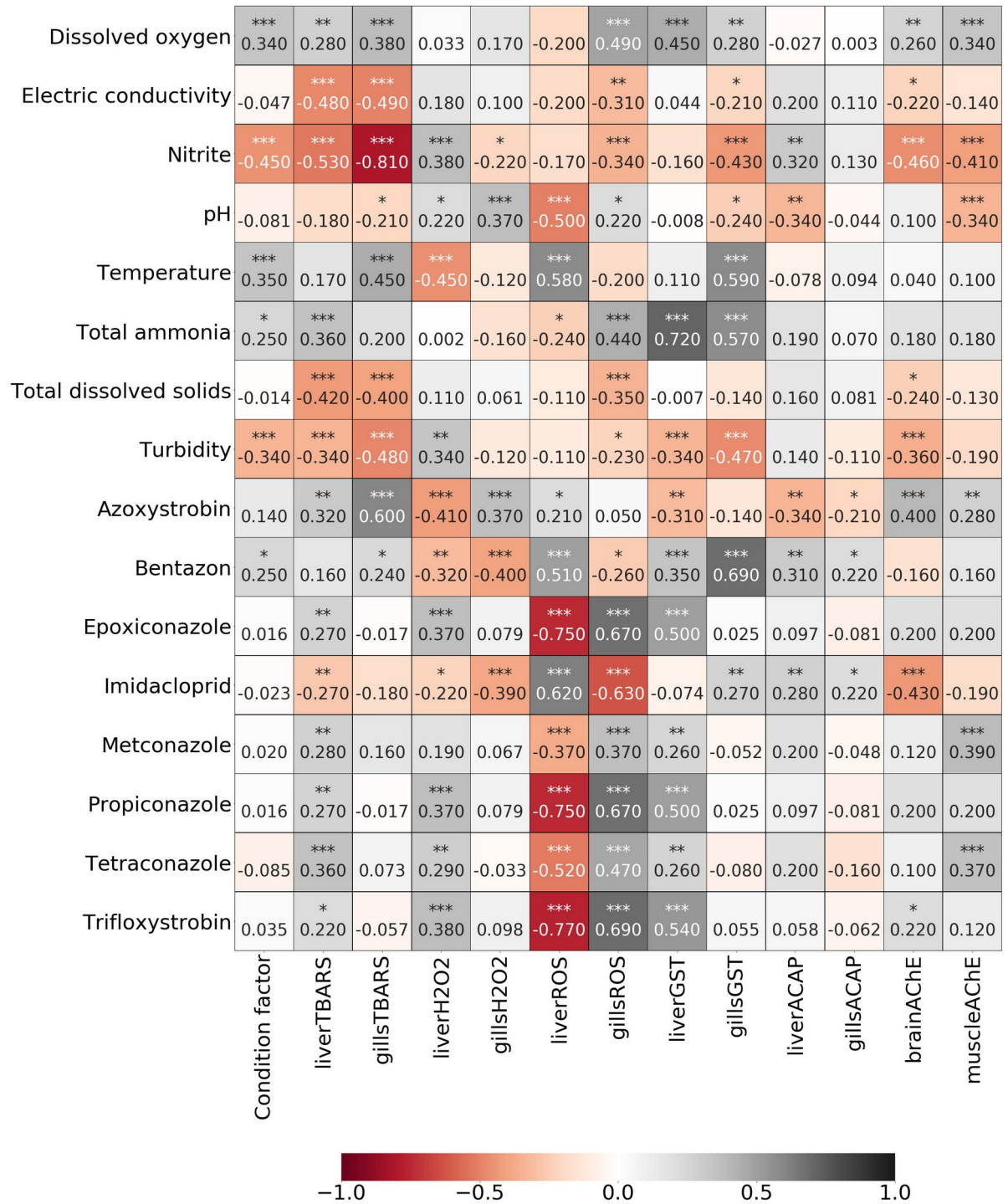
Wood R, Mitrovic SM, Lim RP et al (2016) How benthic diatoms within natural communities respond to eight common herbicides with different modes of action. *Sci Total Environ*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.142>

Yamamoto FY, Garcia JRE, Kupsco A et al (2017) Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.111>

Zhang W, Chen L, Xu Y et al (2019) Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: Changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. *Aquat Toxicol*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.015>

FIGURE

Fig. 1 Heatmap of the Spearman correlation matrix among biomarkers and abiotic parameters in *Astyanax* spp. from Jacuí River



Red and gray colors indicate negative and positive correlations, respectively, (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

TABLES

Table S1. Range of physico-chemical parameters in water from Jacuí River, RS, Brazil

	Summer	Autumn	Winter	Spring
Dissolved oxygen (mg.L ⁻¹)	7.08 – 7.53	6.57 – 7.42	6.53 – 9.85	7.38 – 7.72
Electric conductivity (mS.cm ⁻¹)	0.053 – 0.055	0.054 – 0.065	0.049 – 0.056	0.052 – 0.053
Nitrite (mg.mL ⁻¹)	0.029 – 0.052	0.084 – 0.110	0.035 – 0.072	0.023 – 0.027
pH	6.67 – 6.98	6.87 – 7.47	6.92 – 7.77	6.98 – 7.17
Temperature (°C)	25.44 – 26.22	17.45 – 17.96	15.79 – 18.93	23.40 – 23.72
Total ammonia (μmol.mL ⁻¹)	0.021	0.000 – 0.003	0.021 – 0.035	0.001 – 0.006
Total dissolved solids (g.L ⁻¹)	0.034 – 0.036	0.035 – 0.042	0.032 – 0.036	0.033 – 0.035
Turbidity (NTU)	52.6 – 81.4	98.3 – 100	26.4 – 97.5	7.2 – 78.5

Table S2. Maximum and minimum values of pesticides residues ($\mu\text{g.L}^{-1}$) found in water samples from Jacuí River, RS, Brazil

	Class	LOD	LOQ	Summer	Autumn	Winter	Spring
2,4-D	H	0.120	0.400		< LOQ		na
Atrazine	H	0.006	0.020	na	na	na	0.06 – 0.07
Azoxystrobin	F	0.006	0.020				< LOQ
Bentazon	H	0.120	0.400	< LOQ			
Carbendazim	F	0.006	0.020	na	na	na	< LOQ
Epoxiconazole	F	0.006	0.020			0.033 – 0.059	
Fipronil	I	0.012	0.040	0.04			na
Imidacloprid	I	0.012	0.040	0.08 – 0.11	0.053 – 0.054		0.02 – 0.04
Metconazole	F	0.012	0.040			< LOQ	
Propiconazole	F	0.006	0.020			0.029 – 0.12	
Quinclorac	H	0.012	0.040	0.43 – 0.5	< LOQ		na
Tebuconazole	F	0.024	0.080	< LOQ	< LOQ	na	
Tetraconazole	F	0.012	0.040			0.047 – 0.052	
Trifloxystrobin	F	0.006	0.020			< LOQ	

LOD: limit of detection. LOQ: limit of quantification. na: not analyzed. Classes: F – fungicide, H – herbicide, I – insecticide.

8 DISCUSSÃO

8.1 PESTICIDAS NO RIO JACUÍ

O aumento no consumo de pesticidas gera uma preocupação sobre seu destino final nos ecossistemas aquáticos. Desta maneira, pesquisas acerca da presença desses contaminantes em corpos hídricos é uma questão de elevada importância e necessidade, principalmente para países da América Latina, os quais carecem desse tipo de dados (FURLEY et al., 2017). Em encontro com essa problemática, a presente tese apresenta 2 anos consecutivos de monitoramentos no rio Jacuí (Manuscritos 1 e 3), onde um total de 23 resíduos de pesticidas foram detectados em amostras de água (Tabela 1). Os grupos químicos que apresentaram maior frequência foram triazina, neonicotinoide, triazol e estrobilurina.

O rio Jacuí nasce no norte do estado do Rio Grande do Sul, nas cidades de Passo Fundo e Marau, apresentando uma área total de drenagem de 71.600 km² (incluindo afluentes e as subdivisões da bacia de Alto e Baixo Jacuí). Seu percurso é caracterizado pelo uso do solo por atividades agropecuárias, até alcançar seu delta no lago Guaíba, na região metropolitana de Porto Alegre (FEPAM, 2020). Uma vez que a atividade agrícola possui grande importância nessas sub-bacias hidrográficas, alguns trabalhos evidenciam a lixiviação e escoamento de resíduos de pesticidas de áreas adjacentes. Esses estudos, realizados a montante dos pontos amostrais de Cachoeira do Sul, RS, mostram compostos também detectados nesta tese, e são descritos a seguir:

Bortoluzzi et al. (2006) realizaram monitoramento de pesticidas na água em três etapas da cultura de fumo, após episódios de chuva. Os pontos amostrados estavam inseridos em uma microbacia hidrográfica em Agudo, RS, no arroio Lino, afluente do Rio Jacuí, apresentando características distintas de mata ciliar e de distância de lavouras. Foram detectados 3 pesticidas, entre eles atrazina e imidacloprido, resíduos que apresentaram alta frequência de detecção nas amostras de Cachoeira do Sul. Neste trabalho verificou-se a importância da presença da mata ciliar bem como de uma maior distância das lavouras em relação aos corpos hídricos, uma vez que os pontos amostrais mais preservados não apresentaram resíduos dos pesticidas investigados.

A bacia do Alto Jacuí possui vários lagos artificiais, entre eles o reservatório de Passo Real. Neste ambiente lântico verificou-se diferença sazonal na diversidade de pesticidas,

sendo o inverno o mais diverso. Foram detectados atrazina, azoxistrobina, imidacloprido, propoxur e simazina (do AMARAL et al., 2018). Embora esses compostos também tenham sido detectados em Cachoeira do Sul, possivelmente a menor diversidade de pesticidas no reservatório de Passo Real se deve ao fato do trabalho apresentar resultados de apenas dois momentos de coleta e da diluição resultante do grande volume deste.

No rio Vacacaí, afluente do rio Jacuí, foram realizadas 8 coletas ao longo do ano de 2018 em três pontos amostrais (SEVERO et al., 2020). Foram detectados 24 princípios ativos, dos quais 18 também estiveram presentes nas amostras do rio Jacuí de Cachoeira do Sul. Esta maior similaridade com os resultados dessa tese pode ser em função da maior semelhança nas culturas agrícolas praticadas nas duas regiões bem como pela maior frequência de coletas em ambos os trabalhos. Desta maneira podemos inferir que para resultados mais fidedignos é aconselhável um monitoramento com maior duração bem como maior frequência de amostragens.

Quando comparados os pesticidas detectados nos manuscritos 1 e 3, verificamos uma constância nos tipos de compostos, sendo 11 deles recorrentes. Na Tabela 2 podemos verificar que esses compostos são autorizados pela ANVISA (2019) para aplicação em mesmo tipos de culturas: arroz, cevada, milho, soja e trigo. Estes cultivos foram selecionados pois representam grande parte da produção agrícola de Cachoeira do Sul (Tabela 3) (IBGE, 2020). Podemos inferir que os cultivos apresentados nas tabelas 2 e 3 possivelmente são responsáveis por grande parte dos pesticidas lixiviados para o rio Jacuí na cidade de Cachoeira do Sul, RS. Há uma tendência em repetição na aplicação dos pesticidas visto que são lavouras temporárias com safras distintas ao longo do ano. No entanto, não podemos descartar a possibilidade dos pesticidas serem oriundos de lavouras de curso superior do rio Jacuí bem como de seus afluentes.

Atrazina e imidacloprido foram os compostos com a maior frequência. Dentre os compostos detectados, a atrazina foi o segundo mais vendido no Rio Grande do Sul em 2016 e o terceiro em 2017. O imidacloprido foi o terceiro mais vendido em 2016 e o segundo em 2017 (tabela 1). A presença de atrazina nas amostras de água pode ser oriunda não apenas de sua aplicação em Cachoeira do Sul, mas também de regiões banhadas pelos afluentes do rio Jacuí. Por ser um composto relativamente persistente, com tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) em água superficial de 100 dias à 20 °C, e por apresentar de moderada a alta mobilidade em solos, essa é uma hipótese plausível (WHO, 2011). Imidacloprido apresenta $t_{1/2}$ curta em águas com

incidência de raios solares, sendo rapidamente degradado (MOZA et al., 1998). No entanto, este neonicotinoide possui uma ampla variedade de usos autorizados, fato que contribui por sua detecção em amostras de água superficial.

Embora o 2,4-D tenha sido o composto mais vendido entre os detectados, sua frequência nos monitoramentos foi baixa, sendo amostrado apenas em 2016. Este herbicida apresenta $t_{1/2}$ curta, sendo rapidamente biodegradado em solos (tipicamente < 1 dia a diversas semanas) e em água superficial ($t_{1/2}$ 10 a >50 dias), bem como pode sofrer fotólise no ar ($t_{1/2}$ 1 dia) e na água ($t_{1/2}$ 4-5 dias) (USEPA, 2020). Estas características justificam sua baixa detecção no monitoramento do Rio Jacuí, e possivelmente estas coletas foram subseqüente à aplicação em algum cultivo, sendo lixiviado ao rio.

Felizmente, os pesticidas classificados com maior toxicidade (extremamente tóxico ou altamente perigoso) foram os menos frequentes: 2,4-D, azinfós-etil, carbofurano e metconazol (tabela 1). No entanto, nos deparamos com um dado alarmante sobre o uso indevido de compostos banidos pela ANVISA. Dois organofosforados proibidos foram detectados em 2016: azinfós-etil e triclorfom, banidos no Brasil em 2002 e 2010, respectivamente (tabela 1). A presença desses compostos nas amostras de água sinaliza um perigo aos ecossistemas aquáticos, e possivelmente aponta uma falha na fiscalização. No entanto, como os pesticidas são classificados como poluição difusa, não há como afirmar que esses compostos banidos tenham sido aplicados na região de estudo ou provêm de afluentes. Carbofurano foi proibido em 2017, desta maneira sua detecção apenas em 2016 não representou uso inadequado.

A detecção de resíduos de pesticidas banidos no Brasil nas amostras de água apontam uma problemática econômica e social. Entre 2008 e 2009 um total de 276 apreensões de pesticidas contrabandeados foram registradas pela Polícia Federal. Em muitas dessas ocorrências mais de um composto foi registrado. Além da questão legal, um problema do comércio desses produtos está no fato de que não apresentam padrão de qualidade, podendo estar adulterados, contaminados, estar em concentrações diversas ao registrado nos rótulos, podem apresentar compostos banidos no Brasil ou simplesmente não apresentar o composto especificado (FRAGA et al., 2016). Desta maneira, o comércio ilegal de pesticidas no Brasil coloca em risco a saúde do trabalhador bem como do meio ambiente.

As águas do rio Jacuí abastecem Cachoeira do Sul, assim como outras cidades. O tratamento da água é realizado pela Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN). É realizado tratamento convencional da água, seguindo as seguintes etapas: mistura rápida com

coagulante para remoção das impurezas, floculação, decantação, filtração, desinfecção (através da adição de cloro), e fluoretação (CORSAN, 2020). No entanto, o processo de tratamento de água potável convencional não é capaz de remover adequadamente certos poluentes, como metais, compostos nitrogenados, pesticidas, disruptores endócrinos, entre outros. Dados da literatura mostram que a remoção de poluentes é aumentada quando integra-se ao tratamento convencional alguma metodologia auxiliar, como a utilização de biofilmes, carbono ativado, ozonização catalítica, e membranas orgânicas. Desta maneira estes métodos deveriam ser implementados em países em desenvolvimento (HASAN et al., 2020; MANSAS et al., 2020).

Com o intuito de promover proteção à saúde humana, algumas regulamentações foram implantadas no Brasil. Uma delas se dá através da Portaria nº 2.914/2011, do Ministério da Saúde, a qual define os padrões de potabilidade da água para consumo humano. Neste documento está regulamentado a análise semestral de amostras de água, na captação e após tratamento, de um total de 27 pesticidas, estabelecendo os valores máximos permitidos (VMP) (BRASIL, 2011). Devido as características climáticas, de solo e tipo de produção agrícola do RS, em 2014 entrou em vigor a Portaria nº 320/2014, que instituiu o acréscimo de 46 pesticidas nas análises para avaliação da qualidade da água para consumo humano (RIO GRANDE DO SUL, 2014). A instituição desta portaria estadual possivelmente exercerá maior proteção à saúde humana, visto que, somando à legislação nacional, um total de 73 compostos serão monitorados. No entanto, dos 23 compostos detectados no rio Jacuí (Manuscritos 1 e 3), apenas 6 possuem VMP em água para consumo humano de acordo com a Portaria nº 2.914/2011 (2,4-D, atrazina, carbendazim, carbofurano, simazina e tebuconazol) e 6 através da Portaria nº 320/2014 (carbaril, epoxiconazol, fipronil, imidacloprido, metalaxil-m e tetraconazol). Embora não tenha sido objetivo desta tese, verificar esses dados nos chama atenção pelo fato de que muitos tipos de pesticidas não são investigados. Além disto, como verificado pelos monitoramentos do rio Jacuí, percebemos que a legislação pode induzir ao erro, visto que muitos dos compostos foram detectados em apenas algumas amostragens, evidenciando que análises semestrais seriam insuficientes. Uma vez que o tratamento convencional de água potável não remove completamente os poluentes, estes pesticidas poderiam apresentar resíduos ou metabólitos na água destinada ao consumo humano. A legislação vigente orienta ainda para que os dados municipais relativos a avaliação da qualidade da água sejam inseridos em um banco de dados denominado Sistema de Informação

de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano – SISAGUA. No entanto, em 2014 o RS inseriu poucos dados no SISAGUA, apenas de 33 cidades (equivalente a 6,6% do estado), estando todas as amostras abaixo do VMP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Em termos ambientais, no Brasil, os padrões de qualidade das águas são estabelecidos pela Resolução nº 357/2005 (CONAMA, 2005). Esta resolução aponta, entre outros parâmetros, os VMP de pesticidas em corpos hídricos, a fim de promover saúde e bem-estar humano bem como a proteção das comunidades aquáticas. Dentre os pesticidas detectados no monitoramento do rio Jacuí (Manuscritos 1 e 3), apenas quatro apresentam valores limites estabelecidos (2,4-D, atrazina, carbaril e simazina), estando as amostras abaixo do VMP. Em um monitoramento realizado no rio Uruguai, na cidade de Uruguaiana, RS, 8 resíduos de pesticidas foram detectados, dentre os quais apenas atrazina apresenta VMP, e todas as amostras estavam acima do permitido (LORO et al., 2015). No reservatório de Passo Real, no Alto rio Jacuí, dos 5 pesticidas detectados apenas atrazina e simazina são estabelecidas pela resolução do CONAMA, estando as amostras em acordo com os VMP (DO AMARAL et al., 2018). No monitoramento do rio Vacacaí, dos 24 pesticidas encontrados, apenas 2,4-D e atrazina possuem VMP, estando as amostras em acordo com a resolução (SEVERO et al., 2020). Embora dos trabalhos citados apenas um tenha apresentado resultados em desacordo com a legislação vigente, verifica-se que poucos pesticidas detectados apresentam VMP estabelecidos. Verificamos a necessidade de reavaliação e atualização da mesma, a fim de conferir maior proteção à manutenção dos ecossistemas aquáticos bem como a conservação da biodiversidade brasileira como um todo.

Uma vez que os ambientes aquáticos apresentam uma grande variedade de pesticidas, muitos dos quais não apresentam limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, estudos acerca dos efeitos de exposição em peixes como modelo animal são de extrema relevância. Desta maneira, no próximo tópico são discutidos os resultados de efeitos de exposição a pesticidas em peixes.

Tabela 1. Pesticidas detectados em amostras de água do rio Jacuí, em 2016 e 2017, classe, grupo químico, classificação toxicológica, proibição ao uso no Brasil e consumo no Rio Grande do Sul referente aos anos de coleta

(continua)

Pesticidas	Classe ¹	Proibição de uso (ANVISA)	Grupo químico ^{1,2}	Classe toxicológica		Venda de ingredientes ativos (toneladas) ³		Detecção no rio Jacuí	
				ANVISA ¹	WHO ²	2016	2017	2016	2017
2,4-D	H		Ácido ariloxialcanóico	I	II	5.886,31	6.991,35		x
Atrazina	H		Triazina	III	III	1.074,46	721,62	x	x
Azinfós-etil	I	2002 ⁴	Organofosforado	-	Ib	-	-	x	
Azoxistrobina	F		Estrobilurina	III	U	432,92	172,34	x	x
Bentazona	H		Benzotiadinona	III	II	165,23	206,79	x	x
Carbaril	I		Metilcarbamato de naftila	II	II	-	-	x	
Carbendazim	F		Benzimidazol	III	U	360,82	433,16		x
Carbofurano	I	2017 ⁵	Metilcarbamato de benzofuranila	I	Ib	-	-	x	
Diclofluanida	F		Sulfamida	-	U	-	-	x	
Epoxiconazol	F		Triazol	III	-	107,77	127,39	x	x
Fipronil	I		Pirazol	II	II	108,83	185,96	x	x
Flutolanil	F		Carboxamida	III	U	-	-	x	

¹ ANVISA (2019). ² WHO (2009). ³ IBAMA (2019). ⁴ ANVISA (2002). ⁵ ANVISA (2017). ⁶ ANVISA (2010).

Classe: F = Fungicida; H = Herbicida; I = Inseticida.

Classe toxicológica ANVISA: I = Extremamente tóxico; II = Altamente tóxico; III = Medianamente tóxico; IV = Pouco tóxico.

Classe toxicológica WHO: Ib = Altamente perigoso; II = Moderadamente perigoso; III = Ligeiramente perigoso; U = É improvável que apresente risco agudo em uso normal.

Tabela 1. Pesticidas detectados em amostras de água do rio Jacuí, em 2016 e 2017, classe, grupo químico, classificação toxicológica, proibição ao uso no Brasil e consumo no Rio Grande do Sul referente aos anos de coleta

(conclusão)

Pesticidas	Classe ¹	Proibição de uso (ANVISA)	Grupo químico ^{1,2}	Classe toxicológica		Venda de ingredientes ativos (toneladas) ³		Detecção no rio Jacuí	
				ANVISA ¹	WHO ²	2016	2017	2016	2017
Imidacloprido	I		Neonicotinóide	III	II	687,77	937,10	x	x
Metalaxil	F		Acilalaninato	II	II	-	-	x	
Metconazol	F		Triazol	I	II	-	-		x
Propiconazol	F		Triazol	II	II	158,44	141,17	x	x
Propoxur	I		Metilcarbamato de fenila	II	II	-	-	x	
Quincloraque	H		Ácido quinolinocarboxílico	III	III	-	-	x	x
Simazina	H		Triazina	III	U	151,42	112,33	x	
Tebuconazol	F		Triazol	IV	II	353,59	344,83	x	x
Tetraconazol	F		Triazol	II	II	4,28	1,65	x	x
Triclorfom	I	2010 ⁶	Organofosforado	-	II	-	-	x	
Trifloxistrobina	F		Estrobilurina	II	U	-	-	x	x

¹ ANVISA (2019). ² WHO (2009). ³ IBAMA (2019). ⁴ ANVISA (2002). ⁵ ANVISA (2017). ⁶ ANVISA (2010).

Classe: F = Fungicida; H = Herbicida; I = Inseticida.

Classe toxicológica ANVISA: I = Extremamente tóxico; II = Altamente tóxico; III = Medianamente tóxico; IV = Pouco tóxico.

Classe toxicológica WHO: Ib = Altamente perigoso; II = Moderadamente perigoso; III = Ligeiramente perigoso; U = É improvável que apresente risco agudo em uso normal.

Tabela 2. Culturas autorizadas pela ANVISA aos pesticidas que foram detectados consecutivamente em 2016 e 2017 no rio Jacuí

	Soja	Arroz	Milho	Trigo	Cevada
Atrazina			Sim		
Azoxistrobina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Bentazona	Sim	Sim	Sim	Sim	
Epoxiconazol	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Fipronil	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Imidacloprido	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Propiconazol	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Quincloraque		Sim			
Tebuconazol	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Tetraconazol	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Trifloxistrobina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Autorização da aplicação em lavouras de acordo com ANVISA (2019)

Tabela 3. Produção das principais culturas relacionadas aos pesticidas que foram detectados consecutivamente em 2016 e 2017 no rio Jacuí

Culturas	Produção (toneladas)		Sazonalidade
	2016	2017	
Soja	437.340	458.137	Outubro – abril
Arroz	201.039	212.316	Outubro – abril
Milho	26.100	34.620	Agosto – maio
Trigo	12.137	5.760	Junho – outubro
Cevada	2.600	1.925	Junho – outubro

Fonte: adaptado de IBGE, 2020.

8.2 EFEITO DE PESTICIDAS EM PEIXES

Como descrito no item anterior, os organismos aquáticos estão suscetíveis ao contato com uma gama de poluentes, dos quais os pesticidas são o foco desta tese. A exposição de peixes a pesticidas pode causar vários efeitos, como genotoxicidade, estresse oxidativo, alterações no sistema antioxidante enzimático e não-enzimático, neurotoxicidade, histopatologias, entre outros (LORO et al., 2015, DE OLIVEIRA et al., 2019; FRANCISCO et al., 2019; ROSSI et al., 2020). Nesta tese, verificou-se que a exposição a pesticidas em concentrações ambientais induziu efeitos bioquímicos nos peixes, como alterações no sistema antioxidante enzimático, indução de biomarcadores de dano oxidativo, e modificações na atividade da AChE (Manuscritos 1, 2 e 3). Identificou-se também que a associação dos compostos causa efeito de “potenciação”, aditivo ou antagônico, dependendo do tecido, do biomarcador investigado bem como dos compostos envolvidos.

No Manuscrito 1, tilápias (*Oreochromis niloticus*) foram expostas à atrazina, azoxistrobina e imidacloprido. Verificou-se diferenças tecido específico nas respostas, tendo o músculo apresentado o maior número de alterações, seguido de cérebro, brânquias e fígado. Este resultado evidencia a necessidade do uso de diferentes tecidos para uma análise integral dos organismos, visto que desta maneira é possível ter uma visão global dos efeitos dos xenobióticos nos organismos expostos, como apontado por Vieira et al. (2018). O grupo Mix foi responsável pelo maior número de alterações, provavelmente devido aos efeitos combinados dos pesticidas. Estas respostas no grupo Mix, de uma maneira geral, evidenciam o potencial dos pesticidas induzirem estresse oxidativo e alterações no sistema antioxidante, sendo um risco visto que no ambiente natural os organismos aquáticos estão expostos a uma grande variedade de compostos (LORO et al., 2015; SEVERO et al., 2020). A indução da atividade da AChE em músculo no grupo Mix aparenta um efeito aditivo ou de “potenciação” da combinação dos pesticidas. Isto representa um risco aos peixes, visto que a AChE é uma enzima importante que regula o tônus e a contração muscular. O aumento da atividade da AChE pode diminuir os níveis do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular, impedir a contração muscular e, conseqüentemente, alterar alguns comportamentos dos peixes, como por exemplo, busca de locais de reprodução, busca de alimentos, defesa de território e fuga contra predação (LUSHCHAK, 2011; AMIARD-TRIQUET et al., 2015; SEVERO et al., 2020).

Jundiás (*Rhamdia quelen*) foram expostos aos inseticidas imidacloprido e propoxur, de maneira isolada e em associação. Demonstramos que esses pesticidas, em concentrações ambientalmente relevantes, inibiram a atividade da AChE em tecido cerebral e alteraram vários biomarcadores relacionados ao desequilíbrio oxidativo em todos os tecidos analisados. Assim como no Manuscrito 1, o percentual de perda dos compostos na água no Manuscrito 2 foi maior nos grupos isolados do que no Mix. Isto evidencia que os pesticidas podem interagir entre si, alterando a biodisponibilidade para absorção pelo animal exposto (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Uma diminuição na biodisponibilidade possivelmente acarreta em menores efeitos da exposição. No entanto, a exposição ao Mix foi capaz de induzir um grande número de alterações nos biomarcadores medidos. Embora esses inseticidas sejam neurotóxicos (como verificado pela inibição da atividade da AChE em cérebro), eles têm um mecanismo secundário de toxicidade que pode ser baseado em danos oxidativos.

Embora biomonitoramentos usualmente utilizem apenas indivíduos de uma única espécie, Tincani et al. (2019) mostram que o emprego de organismos agrupados em gênero apresenta sensibilidade adequada, pois ambas 3 espécies de *Astyanax* do estudo apresentaram relações ecotoxicológicas e sensibilidade similares. Este trabalho vai ao encontro do que foi verificado no Manuscrito 3 desta tese, no qual o agrupamento das espécies de lambaris *A. fasciatus* com a *A. jacuhiensis* em gênero para a interpretação da interação entre biomarcadores/pesticidas foi possível visto que testes estatísticos prévios não mostrou diferença entre elas. Desta maneira verifica-se que a utilização de espécies agrupadas em gênero é uma possibilidade em estudos ecotoxicológicos, diminuindo o tamanho das amostras quando comparado com o uso de espécies individualmente. No entanto, deve-se cuidar para que haja homogeneidade na distribuição das mesmas bem como na variabilidade nos valores dos biomarcadores mensurados. No Manuscrito 3 verificou-se que a presença de resíduos de pesticidas no rio Jacuí esteve associada com alterações nos biomarcadores. Embora nesse estudo não tenha sido possível a utilização de um grupo controle para se confirmar que as alterações nas respostas sejam dos pesticidas, dados do Governo do Estado do RS mostram que a maior fonte de poluentes para a bacia hidrográfica provém da atividade agrícola e da pecuária (SEMA/DRH, 2015).

A azoxistrobina foi um dos pesticidas utilizados na correlação com os biomarcadores dos lambaris, assim como foi empregada no experimento com as tilápias. Verificamos correlação positiva deste fungicida com níveis de TBARS em brânquias e fígado, e com

atividade da AChE em cérebro e músculo de lambaris. A exposição de tilápias à azoxistrobina não causou alterações nestes mesmos biomarcadores. Embora uma comparação não pudesse ser feita devido a questões metodológicas envolvidas neste ponto, é possível que haja uma diferença na sensibilidade entre as espécies. Por outro lado, esta diferença pode ser devido aos lambaris estarem expostos no ambiente natural com uma infinidade de fatores, como mistura de compostos, predadores, temperatura, entre outros, e nos induza a uma impressão errônea de sua suscetibilidade – fatores nomeados na ecotoxicologia como *confounding factors* (AMIARD-TRIQUET et al., 2015).

O imidacloprido foi o único pesticida que esteve presente nos 3 manuscritos, possibilitando a comparação do efeito nos mesmos biomarcadores dosados. Verificamos que o maior número de alterações foi observada em jundiás. As tilápias apresentaram poucas respostas à exposição do imidacloprido. Os lambaris apresentaram correlações fracas dos biomarcadores com o imidacloprido, porém mais semelhantes com os jundiás do que com as tilápias. Ambos jundiás e lambaris são peixes nativos, e esta similaridade nas respostas evidencia que a utilização destas espécies em estudos ecotoxicológicos no Brasil devem ser incentivadas. Assim como defendido por Furley et al. (2017), estes organismos melhor representariam os efeitos nos ambientes naturais neotropicais, em comparação com o uso de modelos padronizados exóticos, como o zebrafish (*Danio rerio*).

Além dos efeitos bioquímicos, moleculares, histológicos e comportamentais, a presença de resíduos de pesticidas em amostras de água no rio Jacuí instigam outra preocupação antiga, como a que foi apontada por Rachel Carson em 1962. Muitos compostos são lipossolúveis, fato que facilita sua incorporação nos tecidos dos organismos expostos e sua posterior propagação nas teias tróficas via biomagnificação (DROUILLARD, 2008). Uma vez que o consumo de peixes é recomendado para a manutenção de uma dieta saudável, esta é uma possível fonte de contaminantes para o ser humano e outros organismos piscívoros. No caso do DDT, um inseticida banido mundialmente nas décadas de 1970 e 1980, estudos posteriores mostraram sua persistência no ambiente. Em amostras de tecido adiposo coletadas em dinamarqueses entre 1993 e 1997, por exemplo, verificou-se correlação positiva entre a bioacumulação de DDT ou de seus metabólitos com idade, índice de massa corporal (IMC) e consumo de peixes, principalmente de peixes com alto valor de gordura (BRAUNER et al., 2012). Em outro estudo, realizado no Brasil entre 2001 e 2002, verificou-se a presença de DDT e seus metabólitos em todas as amostras de leite materno coletados em uma população

ribeirinha do rio Madeira, Amazonas (AZEREDO et al., 2008). Em 1990 houve um programa de erradicação do vetor da malária naquela região, com o emprego de DDT nas paredes das casas ribeirinhas. No estudo, a concentração total de DDT em 8,7% das amostras mostraram-se acima do valor de ingestão diária aceitável, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. A região amazônica caracteriza-se por alto consumo de peixes, fato que coloca a população em risco de ingestão de contaminantes ambientais.

Embora nesta tese não tenhamos monitorado a presença de DDT ou seus metabólitos nas amostras de água superficial, outros pesticidas possuem a capacidade de bioacumulação e biomagnificação. Alguns exemplos são a identificação de bioacumulação de atrazina, azoxistrobina, carbaril, fipronil, propoxur, simazina e tebuconazol, entre outros pesticidas, em diferentes espécies de peixes coletadas em trabalhos de campo ou expostas *in situ* (MIRANDA et al., 2008; OLIVEIRA, F. et al., 2015; CLASEN et al., 2018; ROSSI et al., 2020). Mesmo diante do exposto, a ingestão de peixes não deve ser desencorajada, sendo componente importante de uma dieta equilibrada e saudável.

De maneira resumida, os resultados desta tese destacam a ameaça a qual os organismos aquáticos estão suscetíveis, uma vez que eles podem ser expostos a uma ampla variedade de compostos tóxicos. Mesmo com concentrações ambientais, verificou-se estresse oxidativo, alterações no sistema antioxidante e na atividade da AChE, uma importante enzima para o normal funcionamento neuromuscular. Assim como apontado por Petersen (2015), a adoção de valor limite máximo de resíduos pode dar à população uma falsa ideia de segurança, mas como observado nos resultados apresentados nos manuscritos, concentrações baixas de compostos (inclusive abaixo do limite máximo para atrazina) induziu alterações bioquímicas nos peixes. Estes resultados ativam um alerta para que mais estudos sejam executados a fim de aumentar a compreensão dos efeitos das interações de diferentes contaminantes ambientais.

9 CONCLUSÃO

A interpretação dos dados gerados por esta tese permitiu resolver as hipóteses apresentadas no início do estudo, gerando as seguintes conclusões:

- A bacia hidrográfica do Baixo Jacuí, na cidade de Cachoeira do Sul, RS, apresentou grande diversidade de resíduos de pesticidas em amostras ambientais;
- Ainda que em concentrações muito baixas, como as mensuradas durante os monitoramentos, os pesticidas induziram alterações bioquímicas nos peixes;
- Em geral, a exposição à mistura de pesticidas induziu maiores alterações nos biomarcadores dos peixes do que quando expostos ao composto isolado;
- A utilização de espécies nativas em estudos ecotoxicológicos deve ser encorajada, representando com maior fidedignidade o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks**. Academic Press, 1. ed., 2015. ISBN: 978-0-12-800949-9

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 347 de 16 de dezembro de 2002. **Diário Oficial da União**, seção 1, p 88, 31 de dezembro de 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 37 de 16 de agosto de 2010. **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 46, 18 de agosto de 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 185 de 18 de outubro de 2017. **Diário Oficial da União**, edição 201, seção 1, p. 32, 19 de outubro de 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regularização de Produtos – Agrotóxicos – Monografias de Agrotóxicos**, disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>, acesso em 12 de novembro de 2019.

ASSIS, C.R.D. et al. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of The Total Environment**, 441: 141-150, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.058>

BALDISSERA, M.D. et al. Purinergic signaling as potential target of thiamethoxam-induced neurotoxicity using silver catfish (*Rhamdia quelen*) as experimental model. **Molecular and Biochemistry**, 449: 39-45, 2018a. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3340-x>

BALDISSERA, M.D. et al. Gill bioenergetics dysfunction and oxidative damage induced by thiamethoxam exposure as relevant toxicological mechanisms in freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. **Science of The Total Environment**, 636: 420-426, 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.292>

BARRETO, L.S. et al. Urban effluents affect the early development stages of Brazilian fish species with implications for their population dynamics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 188: 109907, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109907>

BECKER, A.G. et al. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72: 1734-1739, 2009. Doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.006

BORTOLUZZI, E.C. et al. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 10(4): 881-887, 2006.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União** - Seção 1 - 12/7/1989, Página 11459.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.**

BRAUNER, E.V. et al. Predictors of adipose tissue concentrations of organochlorine pesticides in a general Danish population. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, 22: 52-59, 2012. <https://doi.org/10.1038/jes.2011.39>

CAGNÉ, F. **Biochemical ecotoxicology: principles and methods**. Academic Press, 1. ed., 2014. ISBN 978-0-12-411604-7

CARSON, R. Primavera silenciosa. [traduzido por Claudia Sant'Anna Martins]. - 1.ed. - São Paulo: Gaia, 2010. ISBN 978-85-7555-235-3

CLASEN, B. et al. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-field system. **Science of the Total Environment**, 626: 737-743, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.154>

CORSAN – Companhia Riograndense de Saneamento (2020) **Tratamento de água**. Disponível em <<http://www.corsan.com.br/tratamentodeagua>>, acesso em 25 de fevereiro de 2020.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005) Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005, Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 march 2005, 53: 58-63.

DE OLIVEIRA, F.G. et al. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. **Science of the Total Environment**, 667: 371-383, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.168>

DEKNOCK, A. et al. Distribution of agricultural pesticides in the freshwater environment of the Guayas river basin (Ecuador). **Science of The Total Environment**, 646: 996-1008, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.185>

DEMIRCI, Ö. et al. (2018) Effects of endosulfan, thiamethoxam, and indoxacarb in combination with atrazine on multi-biomarkers in *Gammarus kischineffensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 147: 749-758, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.038>

DO AMARAL, A.M.B. et al. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, 191: 876-885, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.114>

DOS SANTOS, C.R. et al. Effects of sub-lethal and chronic lead concentrations on blood and liver ALA-D activity and hematological parameters in Nile tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 129: 250-256, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.028>

DOS SANTOS, D.R. et al. The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply—Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 23: 9625-9639, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>

DROUILLARD, K.G. Biomagnification. **Encyclopedia of Ecology**, 2nd edition, Volume 1. doi:10.1016/B978-0-444-63768-0.00377-2

ETCHEGOYEN, M. et al. (2017) Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. **Environmental Monitoring and Assessment**, 189: 63, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5773-1>

FAO – Food and Agriculture Organization (2020a) **Statistics data: Pesticides Use**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>, acesso em 14 de fevereiro de 2020.

FAO – Food and Agriculture Organization (2020b) **Statistics data: Value of Agricultural Production**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>>, acesso em 14 de fevereiro de 2020.

FAO – Food and Agriculture Organization (2020c) **Statistics data: Annual population**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/OA>>, acesso em 14 de fevereiro de 2020.

FEPAM – fundação estadual de proteção ambiental henrique luiz roessler, rs (2020) **Qualidade ambiental: qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio Jacuí**. Disponível em <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_jacui/jacui.asp>, acesso em 23 de fevereiro de 2020.

FIUZA, T.L. et al. Effects of diphenyl diselenide diet on a model of mercury poisoning. **Molecular Biology Reports**, 45: 2631–2639, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4433-z>

FRAGA, W.G. et al. Identificação dos Principais Ingredientes Ativos em Agrotóxicos Ilegais Apreendidos pela Polícia Federal do Brasil e Quantificação do Metsulfurom-metílico e Tebuconazol. *Revista Virtual de Química*, (3), 561-575, 2016.

FRANCISCO, C.D.M. et al. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 82 (8): 514-523, 2019. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1624235>

- FURLEY, T.H. et al. Toward Sustainable Environmental Quality: Identifying Priority Research Questions for Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 14(3): 344-357, 2017. DOI: 10.1002/ieam.2023
- FUZINATTO, C.F. et al. Oxidative stress and hypermethylation induced by exposure of *Oreochromis niloticus* to complex environmental mixtures of river water from Cubatão do Sul, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 114: 190-197, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.025>
- GEISSEN, V. et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, 3(1): 57-65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>
- GONÇALVES, C.R. et al. Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 100: 524–528, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2285-9>
- GRABARKIEWICZ, J.; DAVIS, W. **An introduction to freshwater fishes as biological indicators**. EPA-260-R-08-016. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Environmental Information, Washington, DC, 2008.
- HASAN, H.A. et al. A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. **Journal of Water Process Engineering**, 33: 101035, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101035>
- HOOK, S.E.; GALLAGHER, E.P.; BATLEY, G.E. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 10(3): 327–341, 2014. DOI: 10.1002/ieam.1530
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em 12 de novembro de 2019.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados estatísticos de Cachoeira do Sul, RS**. Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/cachoeira-do-sul/panorama>>, acesso em 17 de fevereiro de 2020.
- IBRAHIM, R.E. et al. Ameliorative effects of Moringa oleifera seeds and leaves on chlorpyrifos induced growth retardation, immune suppression, oxidative stress, and DNA damage in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, 505: 225-234, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.050>
- ICMBio/MMA – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/portal/component/content/article/10187>>, acesso em 12 de novembro de 2019.

ITURBURU, F.G. et al. Ecological Risk Assessment (ERA) of pesticides from freshwater ecosystems in the Pampas region of Argentina: Legacy and current use chemicals contribution. **Science of The Total Environment**, 691: 476-482, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.044>

LEITEMPERGER, J. et al. Behavioural and biochemical parameters in guppy (*Poecilia vivipara*) following exposure to waterborne zinc in salt or hard water. **Molecular Biology Reports**, 46: 3399–3409, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04802-x>

LORO, V.L. et al. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 13(3): 569-578, 2015. DOI: 10.1590/1982-0224-20140146

MANSAS, C. Coupling catalytic ozonation and membrane separation: A review. **Separation and Purification Technology**, 236: 116221, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116221>

MARINS, A.T. et al. Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 151: 191–198, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.021>

MELA, M. et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 93: 13-21, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento de agrotóxicos em água para consumo humano, Brasil, 2014. **Boletim Epidemiológico**. 47(12), 2016. Disponível em <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/abril/08/Monitoramento-de-agrot--xicos-em---gua-para-consumo-humano--Brasil---2014.pdf>>, acesso em 24 de fevereiro de 2020.

MIRANDA, A.L. et al. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, 34: 939-949, 2008. Doi:10.1016/j.envint.2008.02.004

MOZA, P.N. et al. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. **Chemosphere**, 36(3): 497-502, 1998.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. **OECD Test Guidelines for the Chemicals**. Disponível em <<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>>, acesso em 15 de fevereiro de 2020.

OLIVEIRA, F.A. et al. Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 50(6): 398-405, 2015. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011946>

OLIVEIRA, H.H.P. et al. Mixtures of benzo(a)pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish *Rhamdia quelen* than isolated exposures.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 122: 106-115, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.023>

PEREIRA, B.V.R. et al. Cholinesterases characterization of three tropical fish species, and their sensitivity towards specific contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 173: 482-493, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.105>

PETERSEN, P. In: CARNEIRO, F.F. (Org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

PETITJEAN, Q. et al. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. **Science of The Total Environment**, 684: 371-380, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>

RIO GRANDE DO SUL. Portaria nº 320, de 24 de abril de 2014. **Diário Oficial**, Porto Alegre, 28 de abril de 2014.

ROSSI, A.S. et al. Fish inhabiting rice fields: Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxic affects after pesticides application. **Ecological Indicators**, 113: 106186, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106186>

SCHLENK, D. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. **Marine Pollution Bulletin**, 39(1-12): 48-53, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00015-6)

SEMA/DRH – Secretaria Estadual do Meio Ambiente/Departamento de Recursos Hídricos. **Relatório Anual sobre a Situação dos Recursos Hídricos no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2012.

SEMA/DRH – Secretaria Estadual do Meio Ambiente, Departamento de Recursos Hídricos. **Relatório final: Planejamento da Bacia Hidrográfica do Baixo Jacuí, Fases “A”, “B” e “C”**. Porto Alegre, 2015.

SEVERO, E.S. et al. Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 190: 110071, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110071>

SHUKLA, S. et al. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. **Toxicology Reports**, 4: 240-244, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.002>

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. ISBN 85-7383-282-7

SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. ISBN 978-85-7193-263-0

SOLOMON, K.R. et al. Effects of Herbicides on Fish. **Fish Physiology**, 33: 369-409, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00007-8>

SPARLING, D. **Ecotoxicology Essentials: Environmental Contaminants and Their Biological Effects on Animals and Plants**. Academic Press, 1. ed., 2016. ISBN 978-0-12-801947-4

TINCANI, F.H. et al. Climbing the taxonomic ladder: Could a genus be used as bioindicator? The ecotoxicological relationship between biomarkers of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax ribeirae*. **Ecological Indicators**, 106: 105474, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105474>

UN – United Nations. **Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics: Annual Total Population at Mid-Year (thousands)**. Disponível em <<https://population.un.org/wup/DataQuery/>>, acesso em 14 de fevereiro de 2020.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Technical Factsheet on: 2,4-D**. Disponível em <<https://archive.epa.gov/water/archive/web/pdf/archived-technical-fact-sheet-on-2-4-d.pdf>>, acesso em 27 de fevereiro de 2020.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13: 57-149, 2003.

VIEIRA, C.E.D. et al. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 195: 125-134, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.077>

WANG, Y. et al. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*). **Chemosphere**, 170: 61-67, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>

WHO – World Health Organization. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard: and guidelines to classification: 2009**. ISSN 1684-1042

WHO – World Health Organization. **Atrazine and Its Metabolites in Drinking-water Background: document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. Disponível em <https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/antrazine.pdf>, aceso em 27 de fevereiro de 2020.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa. 2. ed. 2008. ISBN 978-85-7656-136-1

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DA CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ: investigação e avaliação do efeito de agroquímicos em jundiás (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) e tilápias (*Oreochromis niloticus*)", protocolada sob o CEUA nº 5537261016 (ID 001173), sob a responsabilidade de **Vânia Lucia Loro e equipe; Aline Teixeira Marins; Jossiele Wesz Leitemperger; Bibiana Silveira Moraes; Eduardo Stringini Severo; Aline Monique Blank do Amaral** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** em sua totalidade com emenda pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 23/03/2020.

We certify that the proposal "BAIXO JACUÍ BASIN BIOMONITORING: Research and evaluation of agrochemical effect on silver catfish (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) and *Oreochromis niloticus*", utilizing 140 Fishes (males and females) of each specie, protocol number CEUA 5537261016 (ID 001173), under the responsibility of **Vânia Lucia Loro and team; Aline Teixeira Marins; Jossiele Wesz Leitemperger; Bibiana Silveira Moraes; Eduardo Stringini Severo; Aline Monique Blank do Amaral** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** with corrections by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 23/03/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2017](#) a [06/2020](#)

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [3 a 6 meses](#)

N: [280](#)

Linagem: [niloticus](#)

Peso: [10 a 20 g](#)

Local do experimento: Os animais serão mantidos no Biotério de experimentação do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE) - UFSM - CCS - Departamento de Farmacologia e Fisiologia, durante os períodos de aclimação e experimentação sendo responsáveis pelo biotério os professores: Dr. Bernardo Baldisserotto e profª Vania Lucia Loro. A exposição In Situ será realizada em 5 pontos amostrais do Rio Jacuí, na cidade de Cachoeira do Sul. Os animais serão transportados para os locais respeitando-se as necessidades de manutenção e cuidado dos mesmos.

Santa Maria, 23 de março de 2020

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56273-1	Data da Emissão: 22/11/2016 14:25	Data para Revalidação*: 22/12/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aline Teixeira Marins	CPF: 021.256.630-07
Título do Projeto: BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ: investigação e avaliação do efeito de agroquímicos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	CNPJ: 95.591.764/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de verão I)	12/2016	03/2017
2	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de outono I)	03/2017	06/2017
3	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de inverno I)	06/2017	09/2017
4	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de primavera I)	09/2017	12/2017
5	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de verão II)	12/2017	03/2018
6	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de outono II)	03/2018	06/2018
7	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de inverno II)	06/2018	09/2018
8	Coleta de amostras nos cinco pontos amostrais. (coleta de primavera II)	09/2018	12/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	VANIA LUCIA LORO	coordenadora da pesquisa	677.861.200-25	1037713706 SJS-RS	Brasileira
2	Eduardo Stringini Severo	auxiliar de campo	023.104.880-70	7090719175 SJS/II-RS	Brasileira
3	Aline Monique Blank do Amaral	auxiliar de campo	014.414.560-07	8093901141 SJS-RS	Brasileira
4	Carjone Rosa Gonçalves	auxiliar de campo	001.264.550-82	1069243441 sjs-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49143648



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56273-1	Data da Emissão: 22/11/2016 14:25	Data para Revalidação*: 22/12/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aline Teixeira Marins	CPF: 021.256.630-07
Título do Projeto: BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUÍ: investigação e avaliação do efeito de agroquímicos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	CNPJ: 95.591.764/0001-05

1	CACHOEIRA DO SUL	RS	Bacia Hidrográfica do Baixo Jacuí	Fora de UC Federal
---	------------------	----	-----------------------------------	--------------------

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rhamdia, Astyanax
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Astyanax, Rhamdia
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Astyanax (*Qtde: 10), Rhamdia (*Qtde: 10)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas (brânquias, cãibra, fígado e músculo)
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Anzol e linha (op.manual); linha de mão, de corso, carretinha, molinete, corrico, vara e isca viva

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49143648





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 56273-1	Data da Emissão: 22/11/2016 14:25	Data para Revalidação*: 22/12/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Aline Teixeira Marins	CPF: 021.256.630-07
Título do Projeto: BIOMONITORAMENTO DO BAIXO JACUL: investigação e avaliação do efeito de agroquímicos	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	CNPJ: 95.591.764/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49143648



Página 3/3