

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

Aline Monique Blank do Amaral

**BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM *Loricariichthys anus*  
(Valenciennes, 1835) E *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824):  
INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS ABIÓTICAS E DA POLUIÇÃO  
AGRÍCOLA**

Santa Maria, RS  
2019

**Aline Monique Blank do Amaral**

**BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835)  
E *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824): INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS  
ABIÓTICAS E DA POLUIÇÃO AGRÍCOLA**

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

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Vania Lucia Loro

Santa Maria, RS  
2019

do Amaral, Aline Monique Blank  
BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM *Loricariichthys anus*  
(Valenciennes, 1835) E *Geophagus brasiliensis* (Quoy &  
Gaimard, 1824): INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS ABIÓTICAS E DA  
POLUIÇÃO AGRÍCOLA / Aline Monique Blank do Amaral.- 2019.  
86 p.; 30 cm

Orientadora: Vania Lucia Loro  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2019

1. Sazonalidade 2. Pesticidas 3. Metais 4.  
Reservatório 5. Passo Real I. Loro, Vania Lucia 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.

---

©2019

Todos os direitos autorais reservados a Aline Monique Blank do Amaral. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

End. Eletr.: nineblank@hotmail.com

Aline Monique Blank do Amaral

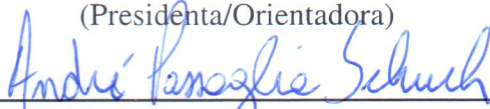
**BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835)  
E *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824): INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS  
ABIÓTICAS E DA POLUIÇÃO AGRÍCOLA**

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

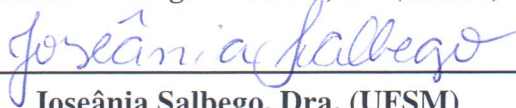
Aprovado em 2 de abril de 2019:



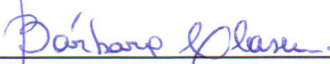
Vania Lucia Loro, Dra. (UFSM)  
(Presidenta/Orientadora)



André Passaglia Schuch, Dr. (UFSM)



Joseânia Salbego, Dra. (UFSM)



Bárbara Estevão Clasen, Dra. (UERGS)



Juliano Zanette, Dr. (FURG) (videoconferência)

Santa Maria, RS  
2019

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meus pais e ao Renan*

## AGRADECIMENTOS

*Ao chegar a este estágio de minha formação acadêmica, primeiramente gostaria de agradecer a todos os meus professores, desde aqueles que me ensinaram a ler e escrever, àqueles que me revelaram a beleza da ciência e àqueles que me instruíram e contribuíram com a minha formação profissional. “Um bom mestre é aquele que inspira seus alunos a aprender e os ensina a pensarem por si mesmos”.*

*Agradeço especialmente àqueles a quem devo a vida e por quem eu daria minha vida, meus pais: Cloedir Vicente Fagundes do Amaral e Elaine Maria Blank do Amaral. Obrigada por todo incentivo, suporte (inclusive tornando-se biólogos por necessidade), compartilhando ansiedades. Amo vocês!*

*Ao homem que escolhi para partilhar meus dias, Renan Rodrigo Duarte, por estar sempre ao meu lado. Dedico este título de doutorado a você. Sem a tua ajuda, esforço e empenho em aprender temas relacionados a área da biologia, esta tese não estaria finalizada. Te amo muito!*

*Aos meus familiares de sangue (Blank do Amaral) e àqueles de coração (Oliveira Duarte) pela força, carinho.*

*Aos meus queridos tios Jair Blank e Jureci Goulart Blank pela receptividade em sua casa (que se transformou em um laboratório temporário), por todo amor, carinho, pela comida saborosa. Obrigada por todo apoio, por me considerarem uma filha!*

*Aos meus primos, em especial Julia Caroline Goulart Blank (por nossas conversas políticas e incentivo para ser a primeira doutora da família...agora é tua vez!) e Jonatan Neske Blank (pelo conhecimento na área agrícola e pelos causos engraçados).*

*Ao pescador senhor Adelar Feder, cuja disponibilidade e conhecimento foram indispensáveis para a realização das coletas de dados que compõem esta tese.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Vania Lucia Loro pela oportunidade de trabalhar com o que amo (bioquímica) aliando com a questão ecológica, por confiar no meu trabalho.*

*Em especial aos professores ictiólogos Dr. Bernardo Baldisseroto e Dr. Everton Behr pelas sugestões e prestatividade.*

*Aos membros da banca de qualificação (Dr<sup>a</sup> Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Dr<sup>a</sup> Charlene Cavalheiro de Menezes, Dr. Leonardo José Gil Barcellos, Dr<sup>a</sup> Guendalina Turcato Oliveira, Dr. André Passaglia Schuch) pelas correções, contribuições e melhoramento do meu primeiro artigo.*

*Aos membros da banca de defesa desta tese (Dr. André Passaglia Schuch, Dr<sup>a</sup> Bárbara Estevão Clasen, Dr<sup>a</sup> Joseânia Salbego, Dr. Juliano Zanette) pelas contribuições, elogios e questionamentos.*

*À equipe do LARP (Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas), especialmente ao professor Dr. Renato Zanella, pela cooperação com este trabalho.*

*Aos colegas do LabTAq pelas conversas, rodas de chimarrão, risos. À Dr<sup>a</sup> Camila Rebellatto Murussi pelo acolhimento quando cheguei no laboratório, pelos ensinamentos na área da bioquímica e pelos momentos de descontração. Aos amigos Tamiris Rosso Storck e Taisson Kroth Thomé da Cruz pela amizade verdadeira e espontânea e de vital importância nos momentos finais do doutorado. À Luciana Joner Guerra e Jeane de Lima Costa Gomes por estarem sempre ao meu lado. Aos meus pupilos Gustavo Henrique Weimer, Dionatan de Pellegrin, Gracielle da Silva Felix Nene, Rafaela Rosa Machado de Souza, Leticia Kuhn de Moura por serem minha “válvula de escape” em momentos de tristeza, angústia e desesperança (e “jiboiar” na grama do prédio 18 depois do almoço). À amiga e colega de mestrado/doutorado, herpetóloga Suelen Alves Saccol pelas relaxantes conversas pelo Campus. Aos queridos primos Felipe Osmani Cerezer e Cristina Cerezer. À Jaíne Ames que, mesmo em pouco tempo de convivência, já se mostrou uma grande amiga!*

*Ao Fabian Drews Abaid pelas longas conversas, conselhos, incentivos e interesse na minha pesquisa. À Nadja Magdalena Köhler Dal Ri pelo carinho e auxílio. Ao Vinicius Geissler pelo apoio e incentivo.*

*À CAPES pelo auxílio financeiro e aos Programas de Pós-Graduação Biodiversidade Animal e Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria.*

*A cobiça envenenou a alma dos homens...  
levantou no mundo as muralhas do ódio...  
e tem-nos feito marchar a passo de ganso  
para a miséria e os morticínios. Criamos a  
época da velocidade, mas nos sentimos en-  
clausurados dentro dela. A máquina, que  
produz abundância, tem-nos deixado em  
penúria. Nossos conhecimentos fizeram-  
nos céticos; nossa inteligência, empeder-  
nidos e cruéis. Pensamos em demasia e  
sentimos bem pouco. Mais do que de má-  
quinas, precisamos de humanidade. Mais  
do que de inteligência, precisamos de afei-  
ção e doçura. Sem essas virtudes, a vida  
será de violência e tudo será perdido.*

*(Charlie Chaplin em O Grande Ditador, 1940)*



## RESUMO

### **BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) E *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824): INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS ABIÓTICAS E DA POLUIÇÃO AGRÍCOLA**

AUTORA: Aline Monique Blank do Amaral

ORIENTADORA: Vania Lucia Loro

Ambientes límnicos estão ameaçados mundialmente, recebendo cargas de poluentes oriundos de diversas atividades antrópicas. O Brasil é um dos maiores consumidores de agroquímicos, em especial pesticidas. Estes, acabarão entrando nos sistemas aquáticos via diversos mecanismos e poderão ficar represados, especialmente nos reservatórios, afetando direta ou indiretamente os organismos que ali vivem. Biomarcadores de toxicidade são muito utilizados em trabalhos de ecotoxicologia para verificar desvios da função normal. Porém, biomarcadores podem flutuar sazonalmente em razão de fatores abióticos/biológicos, como a temperatura que governa a fisiologia de animais ecotérmicos. Neste estudo, duas espécies de peixes (*Loricariichthys anus* e *Geophagus brasiliensis*) foram coletadas juntamente com variáveis abióticas, sazonalmente, durante um ano em seis locais no reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, região sul do Brasil. Foram detectados oito pesticidas na água. Sendo a temperatura o fator chave para regulação fisiológica, comparando os dados dos biomarcadores de *L. anus* coletados no verão e inverno pode-se perceber que no inverno houve maiores alterações no fígado (aumento de GST e GPx) e no verão nas brânquias (elevação de GST, GPx e TBARS). Aumento da AChE em cérebro e músculo no inverno esteve associado com a carbonilação de proteínas. Como as variáveis atuam concomitantemente sob os organismos, foi realizada uma análise de redundância para ambas as espécies, considerando as respostas bioquímicas e dados de pesticidas, metais e fatores abióticos das quatro estações. Desta forma, ficou evidente que não somente os pesticidas afetam a resposta dos biomarcadores, mas também amônia, nitrato, condutividade elétrica e temperatura. A sazonalidade foi visivelmente fundamental para as duas espécies. Apesar de ser difícil separar as flutuações normais dos biomarcadores daquelas relacionadas à exposição dos poluentes, a longo prazo, esses podem causar efeitos indiretos às populações destas espécies, ao reduzir os recursos alimentares ou afetar o *fitness* ao desviar energia para produção de defesas antioxidantes, reduzindo o investimento em outras atividades como reprodução.

**Palavras-chave:** Sazonalidade. Pesticidas. Metais. Reservatório. Passo Real.

## ABSTRACT

### **TOXICITY BIOMARKERS IN *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) AND *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824): INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS AND AGRICULTURAL POLLUTION**

AUTHOR: Aline Monique Blank do Amaral

ADVISOR: Vania Lucia Loro

Limnic environments are threatened worldwide, receiving loads of pollutants from various anthropogenic activities. Brazil is one of the largest consumers of agrochemicals, especially pesticides. These will eventually enter the aquatic systems via several mechanisms and may be dammed, as in the reservoirs, affecting directly or indirectly their dwellers. Toxicity biomarkers are widely used in ecotoxicology to verify deviations from the normal function. However, biomarkers may fluctuate seasonally due to abiotic/biological factors, such as the temperature that governs the physiology of ectothermic animals. In this study, two species of fish (*Loricariichthys anus* and *Geophagus brasiliensis*) were collected seasonally along with abiotic variables during one year at six sites in the Passo Real reservoir, in the Upper Jacuí basin, southern Brazil. Eight pesticides were detected in the water. As temperature is the key factor for physiological regulation, comparing biomarkers data from *L. anus* collected in the summer and in the winter, it can be seen that in the winter there were major changes in the liver (increase of GST and GPx) and in the gills in the summer (elevation of GST, GPx and TBARS). Increased AChE in brain and muscle in the winter was associated with carbonylation of proteins. As the variables act concomitantly on the organisms, a redundancy analysis was performed for both species, considering the biochemical responses and data of pesticides, metals and abiotic factors of the four seasons. In this way, it was evident that not only the pesticides affect the biomarkers response, but also ammonia, nitrite, electrical conductivity and temperature. Seasonality was clearly fundamental for both species. Although it is difficult to separate the normal fluctuations of biomarkers from those related to the exposure of pollutants, in a long-term, these can cause indirect effects to the populations of these species by reducing food resources or affecting fitness by diverting energy to produce antioxidant defenses, reducing investment in other activities such as reproduction.

**Keywords:** Seasonality. Pesticides. Metals. Reservoir. Passo Real.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Espécime de <i>L. anus</i> , coletado no Reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, em fevereiro de 2016. ....	15
Figura 1.2 – Espécime de <i>G. brasiliensis</i> , coletado no Reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, em fevereiro de 2016. ....	16
Figura 1.3 – Localização da bacia hidrográfica do Alto Jacuí e os principais municípios abrangidos. ....	17
Figura 1.4 – Usinas e centrais hidrelétricas em cascata ao longo do rio Jacuí, na bacia hidrográfica do Alto Jacuí, RS, Brasil. ....	18
Figura 1.5 – Bacia hidrográfica do Alto Jacuí, localizada na região centro-norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Em destaque o reservatório Passo Real e os principais rios formadores. ....	19
Figura 1.6 – Características dos seis locais de coleta no reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, RS, Brasil. ....	20
Figura 2.1 – Location of the sampling sites in Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil. ....	25
Figura 2.2 – Liver biochemical analysis in summer and winter. ....	30
Figura 2.3 – Gills biochemical analysis in summer and winter. ....	31
Figura 2.4 – Brain biochemical analysis in summer and winter. ....	32
Figura 2.5 – Muscle biochemical analysis in summer and winter. ....	33
Figura 3.1 – Passo Real reservoir, located in the Alto Jacuí basin, southern Brazil. Circles filled represent the six samples sites. ....	45
Figura 3.2 – Redundancy analysis of <i>Loricariichthys anus</i> showing sampling sites (1 to 6) in each season. ....	49
Figura 3.3 – Redundancy analysis of <i>Geophagus brasiliensis</i> showing sampling sites (1 to 6) in each season. ....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Common crops in the surrounding areas of Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil and the months of planting (P) and harvesting (H).....	26
Tabela 2.2 – Abiotic data from the six sites at different seasons at Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil.....	28
Tabela 2.3 – Pesticides found in the water ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) from the six sampling sites at different seasons at Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil. Determination of pesticide residues using SPE and LC-MS/MS analysis....	29
Tabela 3.1 – Abiotic data collected over a year at six sites in the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil.....	59
Tabela 3.2 – List of agrochemicals found in the water at six sites over a year (2016) in the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil.....	60
Tabela 3.3 – List of pesticides investigated in the water of the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil.....	61
Tabela 3.4 – Heavy metals and trace elements (mg/L) (total/filtered) found in water at the six sites over a year (2016) in the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil.....	63
Tabela A.1 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de <i>Loricariichthys anus</i> nas estações verão (ve) e outono (ou).....	81
Tabela A.2 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de <i>Loricariichthys anus</i> nas estações inverno (in) e primavera (pr).....	83
Tabela A.3 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de <i>Geophagus brasiliensis</i> nas estações verão (ve) e outono (ou).....	85
Tabela A.4 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de <i>Geophagus brasiliensis</i> nas estações inverno (in) e primavera (pr).....	86

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	POLUENTES EM AMBIENTES LÍMNICOS E EFEITOS DE TOXICIDADE .....	12
1.2	ORGANISMOS DE ESTUDO .....	14
1.3	LOCAL DE ESTUDO .....	16
1.4	OBJETIVOS .....	21
<b>1.4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
1.5	ESTRUTURA DO DOCUMENTO .....	21
<b>2</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>22</b>
	ABSTRACT .....	22
2.1	INTRODUCTION .....	23
2.2	MATERIAL AND METHODS .....	25
<b>2.2.1</b>	<b>Biochemical Analyses</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Statistics</b> .....	<b>27</b>
2.3	RESULTS .....	27
<b>2.3.1</b>	<b>Abiotic Factors</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Biomarkers</b> .....	<b>28</b>
2.4	DISCUSSION .....	33
	ACKNOWLEDGEMENTS .....	36
	REFERENCES .....	36
<b>3</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>42</b>
	ABSTRACT .....	42
3.1	INTRODUCTION .....	43
3.2	MATERIAL AND METHODS .....	44
<b>3.2.1</b>	<b>Study Area</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Organisms</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Abiotic Variables and Pollutant Analysis</b> .....	<b>46</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Biomarkers of Toxicity</b> .....	<b>46</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Statistics</b> .....	<b>47</b>
3.3	RESULTS .....	48
3.4	DISCUSSION .....	51
	ACKNOWLEDGEMENTS .....	53
	REFERENCES .....	53
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>64</b>
4.1	ARGUMENTAÇÃO .....	64
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>68</b>
5.1	CONCLUSÕES GERAIS .....	68
5.2	TRABALHOS FUTUROS .....	68
5.3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	69
<b>5.3.1</b>	<b>Artigos Completos Publicados em Periódicos</b> .....	<b>69</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Trabalhos Publicados em Anais de Congressos</b> .....	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE A – TABELAS DE DADOS DO ARTIGO 2</b> .....	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

*Este capítulo aborda brevemente a temática da tese e expõe a problemática a ser desenvolvida ao longo dos demais capítulos.*

## 1.1 POLUENTES EM AMBIENTES LÍMNICOS E EFEITOS DE TOXICIDADE

Apesar de compreenderem apenas 0,01% do total de águas, os ambientes límnicos estão entre os ecossistemas mais ameaçados globalmente (DUDGEON et al., 2006). Sua maior vulnerabilidade deve-se à posição que ocupam na paisagem. São considerados receptores naturais de materiais, especialmente aqueles de origem antrópica, uma vez que grande parte das populações humanas vive próxima a grandes rios ou riachos (ALLAN & CASTILLO, 2007).

Embora o Brasil possua uma das maiores malhas hidrográficas do planeta, compreendendo 12% da água doce mundial, a grande maioria dos seus corpos hídricos sofre algum tipo de pressão antrópica (ANA, 2012). Um dos problemas mais preocupantes no cenário atual é o abusivo consumo de agroquímicos, que são utilizados durante todo o processo de produção agrícola. O mercado brasileiro de insumos agrícolas cresceu 190% nos últimos anos, ultrapassando os Estados Unidos, ocupando hoje o posto de maior mercado de agrotóxicos do mundo (RIGOTTO et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2016; GHISI et al., 2017). Além disso, o sistema de plantio empregado, especialmente em pequenas propriedades rurais como forma de aumentar a renda, baseia-se no uso intensivo da terra com rotação de culturas ao longo de todo o ano. Assim, agroquímicos de diferentes classes (herbicidas, inseticidas, fungicidas) ou aqueles com aplicabilidade em um amplo espectro de culturas (e.g. imidacloprido) são utilizados de forma sucessiva e ininterrupta (BORTOLUZZI et al., 2006). Soma-se a isso, a impossibilidade de tempo necessário à recuperação dos solos agrícolas em relação a nutrientes. Desta forma, fertilizantes são indispensáveis para o crescimento e garantia de produção de muitas culturas. Apesar de parecerem inertes em relação a poluentes, fertilizantes podem conter elementos traço como cádmio, cobalto, cobre, zinco, chumbo e níquel em sua composição (GIMENO-GARCÍA et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2016).

De forma geral, a maior parte dos agroquímicos, independentemente do modo de aplicação, acaba se afastando de seu alvo e entrando em ecossistemas aquáticos, principalmente devido aos ventos, à deposição atmosférica e à água das chuvas, que promovem escoamento superficial, a lavagem de folhas tratadas, a lixiviação e a erosão (TOMITA & BEYRUTH, 2002; SILVA & FAY, 2004). Em sistemas lóticos, em função da vazão constante, esses contaminantes são continuamente dissipados. Ambientes lênticos como reservatórios funcionam como bacias de decantação de detritos sólidos e de poluentes (CHRISTOFOLETTI, 1981). O fluxo de água em reservatórios utilizados para a geração de energia elétrica é controlado de acordo

com a demanda energética. Por isso, estes locais apresentam períodos de total estagnação da água alternados com momentos de retorno da circulação que causa revolvimento dos materiais acumulados nos sedimentos (AMMAR et al., 2015).

Entrando nos ambientes aquáticos, xenobióticos, dependendo de suas características físico-químicas (para pesticidas especialmente solubilidade em água ( $S_w$ ) e coeficiente de partição n-octanol água ( $K_{ow}$ )), podem interagir com os organismos que ali habitam através das vias dérmicas, respiratórias e/ou oral. Dentro do organismo, essas substâncias poderão ser biotransformadas e excretadas sem causar alterações nas vias metabólicas (VAN DER OOST et al., 2003; STOLIAR & LUSHCHAK, 2012). Porém, a maioria destes poluentes são conhecidos por causarem algum tipo de efeito negativo. Alterações neurológicas são esperadas quando poluentes alteraram a atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável pela terminação do impulso nervoso (ROMANI et al., 2003; MODESTO & MARTINEZ, 2010; ALTENHOFEN et al., 2017; TOPAL et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018). A atividade desta enzima é essencial para o comportamento normal e função muscular (PAYNE et al., 1996; KIRBY et al., 2000; XING et al., 2010).

Pesticidas e metais pesados são conhecidos também por afetarem enzimas responsáveis pela manutenção do balanço redox ou causarem um aumento anormal na produção de radicais livres. Durante o processo normal de geração ATP na mitocôndria, cerca de 10% das moléculas de oxigênio não são totalmente reduzidas a água através do mecanismo de redução de quatro elétrons pela citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons (LUSHCHAK, 2016). Esse escape de elétrons da cadeia transportadora produz espécies reativas de oxigênio (EROs) (radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , oxigênio singlete  $1O_2$ , peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , radical hidroxila  $OH^{\cdot}$ ). Estas substâncias reativas não eliminadas/neutralizadas poderão iniciar uma cascata de reações que produz mais moléculas altamente reativas.

Por isso, ao longo da evolução, os organismos desenvolveram mecanismos para manter em um estado de equilíbrio produção/eliminação destes intermediários (LUSHCHAK, 2016). Os antioxidantes podem ser enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos, que atuam como cofatores (tióis não proteicos, glutathione (GSH)). Além dessas defesas antioxidantes, há enzimas que atuam nas reações de biotransformação de xenobióticos como a glutathione-S-transferase que conjuga moléculas com GSH, tornando o composto tóxico mais hidrofílico e fácil de eliminar do organismo. Metalotioneínas, além de participar do armazenamento e detoxificação de íons metálicos como zinco, cobre e cádmio (VIARENGO et al., 2007; FERNANDES et al., 2008) podem atuar como sequestradoras de espécies reativas já existentes ou evitar o início de reações oxidativas por metais (RUTTKAY-NEDECKY et al., 2013). No caso de falha no mecanismo antioxidante, danos a biomoléculas como lipídios, proteínas e até DNA podem acontecer.

Porém não somente xenobióticos podem causar mudanças no metabolismo, levando a variações nas atividades de enzimas antioxidantes, de detoxificação ou de neutotoxicidade bem como na produção de espécies reativas. Variáveis abióticas como temperatura, oxigênio dis-

solvido e o hábito alimentar do organismo podem influenciar nas respostas (RADI et al., 1985; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVIN, 2002; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005; LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006). Um aumento na temperatura da água causa um aumento no consumo de oxigênio e provavelmente um aumento na produção de espécies reativas e na captação de compostos (LAETZ et al., 2014). Por outro lado, em temperaturas baixas, o aumento da poli-insaturação (ácidos graxos poli-insaturados) de membranas mitocondriais deve aumentar as taxas de respiração mitocondrial e conseqüentemente a formação de espécies reativas (PAVLOVIĆ et al., 2010). Apesar de permitir a manutenção da fluidez das membranas, um aumento no conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados também aumenta o risco de peroxidação, já que estes são alvos de espécies reativas (STORELLI et al., 1998; ABELE & PUNTARULO, 2004). Peroxidação lipídica é um processo de auto-propagação onde um radical peroxil é formado quando espécies reativas de oxigênio tem reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um lipídio intacto (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; VINAGRE et al., 2012). Os produtos primários da peroxidação lipídica são hidroperóxidos e os secundários são aldeídos incluindo malondialdeído e 4-hidroxinonenal. Malondialdeído, o principal produto final da peroxidação, é gerado pela decomposição do ácido araquidônico e de poli-insaturados maiores (ESTERBAUER et al., 1991; AYALA et al., 2014). Membranas celulares apresentando danos lipídicos tornam-se rígidas e perdem permeabilidade e integridade (VALAVANIDIS et al., 2006). Além disso, o malondialdeído pode reagir com cadeias de aminoácidos e causar carbonilação, modificação estrutural que leva à perda da funcionalidade de enzimas e de proteínas. Cisteína e metionina são particularmente propensas ao ataque oxidativo de quase todas as EROs (DALLE-DONNE et al., 2003). Apesar de ser uma modificação proteica irreversível, carbonilação de proteínas é um processo normal, sendo que a oxidação induzida pelas EROs apenas adiciona novos grupos carbonila (DALLE-DONNE et al., 2003; LUSHCHAK, 2011). Proteínas pesadamente oxidadas tendem a acumular-se nas células (WIDMER et al., 2006; DUNLOP et al., 2009) podendo comprometer as defesas antioxidantes, função celular e sobrevivência (PADMINI, 2010).

## 1.2 ORGANISMOS DE ESTUDO

Peixes são utilizados como biomonitores de poluição *in situ* pois refletem rapidamente em alterações fisiológicas quantificáveis as mudanças que ocorrem nos ambientes aquáticos (NASCIMENTO et al., 2012). São organismos fáceis de coletar e podem ser amostrados durante todo o ano, permitindo a avaliação das mudanças sazonais (CARVALHO et al., 2012; SERAFIM et al., 2012), apresentam tempo de vida longo, fornecendo um registro temporal de exposição a contaminantes. Estão incluídos em uma variedade de níveis tróficos (onívoros, carnívoros, insetívoros, herbívoros, etc), muitos encontram-se no topo da cadeia alimentar, possibilitando obtenção de informações sobre bioacumulação, e, além disso, podem ser mantidos



em laboratório para obter informações mais acuradas sobre os mecanismos de ação de poluentes (JARAMILLO-VILLA & CARAMASCHI, 2008).

O Brasil é um dos países com maior riqueza de espécies de peixes de água doce, com registro de 2500 espécies, sendo as famílias Characidae, Loricariidae, Cichlidae e Rivulidae as mais numerosas (BUCKUP et al., 2007). No estado do Rio Grande do Sul há cerca de 422 espécies, de 38 famílias sendo Loricariidae com o maior número de espécies (88) seguido por Characidae (80), Cichlidae (44), e Rivulidae (34) (BERTACO et al., 2016). Sendo animais ectotérmicos, o metabolismo dos peixes é governado pela temperatura da água. Por ser uma região de clima subtropical, o sul do Brasil apresenta uma grande amplitude térmica. No verão as temperaturas médias são 23 °C e no inverno 13 °C (ROSSATO, 2011). Peixes que habitam essas regiões exibem plasticidade para manter o metabolismo dentro de uma faixa adequada em função da flutuação de temperatura ao longo do ano (GARCIA et al., 2008).

*Loricariichthys anus* (Siluriformes: Loricariidae), conhecido popularmente como cascudo (Figura 1.1), distribui-se em rios costeiros do sul do Brasil e das bacias do rio Uruguai e do baixo rio Paraná. Apresenta hábito bentônico, ocorrendo em rios e lagoas de fundo arenoso ou argiloso (REIS & PEREIRA, 2000). A boca forma um disco sugador permitindo que eles se adiram ao substrato, onde podem raspar algas, pequenos invertebrados e detritos (ALBRECHT & SILVEIRA, 2001; REIS et al., 2003; COVAIN & FISCH-MULLER, 2007). Esta espécie é bem adaptada a ambientes lênticos com baixo teor de oxigênio (QUEROL et al., 1996; DE BRITO et al., 2014). Além disso, parece ser indiferente ao aporte de esgoto e metais pesados (BRUSCHI, 1998; ALBRECHT & SILVEIRA, 2001). Em relação a reprodução, peixes do gênero *Loricariichthys* apresentam um desenvolvimento hipertrófico dos lábios, onde os machos incubam os ovos durante a época quente de reprodução (QUEROL et al., 2002). A família Loricariidae pode ser considerada como um modelo para estudos ecotoxicológicos, pois eles podem interagir com xenobióticos tanto na coluna de água quanto no sedimento.

Figura 1.1 – Espécime de *L. anus*, coletado no Reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, em fevereiro de 2016. Apresenta aproximadamente 24 cm e 56 g.



Fonte: Autora.

*Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae), o cará (Figura 1.2), ocorre em rios

costeiros do leste e sul do Brasil e do Uruguai (OSÓRIO et al., 2014). Habita locais lodosos de ambientes lóticos e lênticos (KULLANDER, 2003). Alimenta-se de detritos, pequenos peixes, macroinvertebrados, plantas e algas (CASEMIRO et al., 2005; GARCIA et al., 2006). *G. brasiliensis* apresenta uma boa tolerância a variação de temperatura (15-30 °C) (OSÓRIO et al., 2014).

Figura 1.2 – Espécime de *G. brasiliensis*, coletado no Reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, em fevereiro de 2016. Apresenta aproximadamente 13 cm e 42 g.



Fonte: Autora.

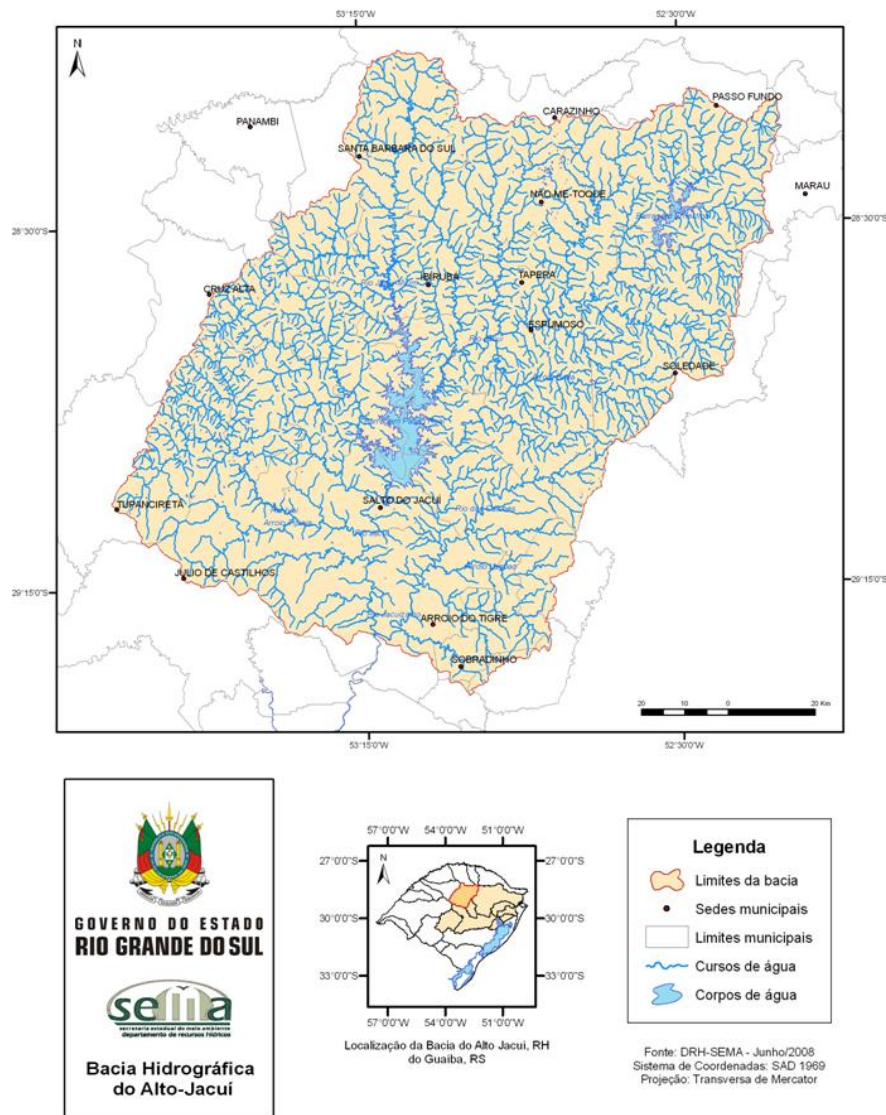
### 1.3 LOCAL DE ESTUDO

A bacia hidrográfica do Alto Jacuí (Figura 1.3) está localizada na região centro-norte do Estado do Rio Grande do Sul, na região hidrográfica do Guaíba. Abrange, total ou parcialmente 42 municípios.

O clima é do tipo subtropical úmido (Cfa) de acordo com a classificação de Köppen com chuvas bem distribuídas ao longo do ano (ZIANI et al., 2017). Está inserida nas regiões geomorfológicas do Planalto das Araucárias e Planalto das Missões. A grande amplitude altimétrica (de aproximadamente 700 metros de altitude) na bacia e a presença de vales encaixados na área de estudo propiciaram a construção de usinas hidrelétricas para geração de energia. Nesta bacia destaca-se a presença de quatro usinas hidrelétricas (Ernestina, Passo Real, Leonel de Moura Brizola e Itaúba) e seis pequenas centrais hidrelétricas (Colorado, Pinheirinho, Cotovelo Jacuí, Dreher, Ivaí e Kotzian) (Figura 1.4).

82% da bacia está inserida no bioma Mata Atlântica e 18% no bioma Pampa. Era ocupada originalmente pela Floresta de Araucária, Floresta Estacional Decidual (Floresta Caducifolia) e Savana (Cerrados e Campos). Atualmente culturas anuais como fumo, milho, soja, trigo, aveia, azevém e canola e campos de pecuária substituíram estas formações vegetais. Nesta região, o consumo de agrotóxicos registrado entre 2009-2010 foi de cerca de 919 L/km<sup>2</sup> (14.711.970 litros por ano), um dos maiores valores considerando as demais bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul. Dentre os principais agrotóxicos utilizados, de acordo com um levantamento junto aos produtores rurais, estão glifosato, trimetilbenzeno, metamido-

Figura 1.3 – Localização da bacia hidrográfica do Alto Jacuí e os principais municípios abrangidos.

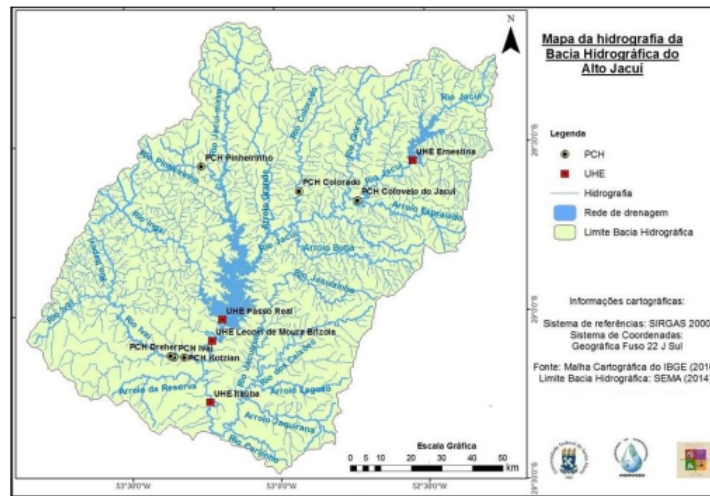


Fonte: Secretaria do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, 2008.

fós, diflubenzuron, triflumuron, ensossulfan, trifloxistrobina, metomil, diuron, piraclostrobina e azoxistrobina (BARRETO et al., 2012).

O reservatório Passo Real (Figura 1.5, em destaque) possui perímetro de 610 km, área de 233,39 km<sup>2</sup> (CEEE-GT, 2011) e 3.671 km<sup>3</sup> de volume. Está em funcionamento desde 1973 e opera com potência de 158 MW. Está inserido no Planalto Meridional (WACHHOLZ, 2011). Formado pelos rios Jacuí, cuja nascente está localizada na cidade de Passo Fundo, rio Ingaí, Ivaí e Jacuizinho. Está localizado 12 km a montante da barragem Maia Filho e 190 km a jusante da barragem de Ernestina (CEEE-GT, 2011). O tempo de residência médio da água é de 187 dias (de acordo com dados registrados entre 1973-2006). A presença de latossolo verme-

Figura 1.4 – Usinas e centrais hidrelétricas em cascata ao longo do rio Jacuí, na bacia hidrográfica do Alto Jacuí, RS, Brasil.

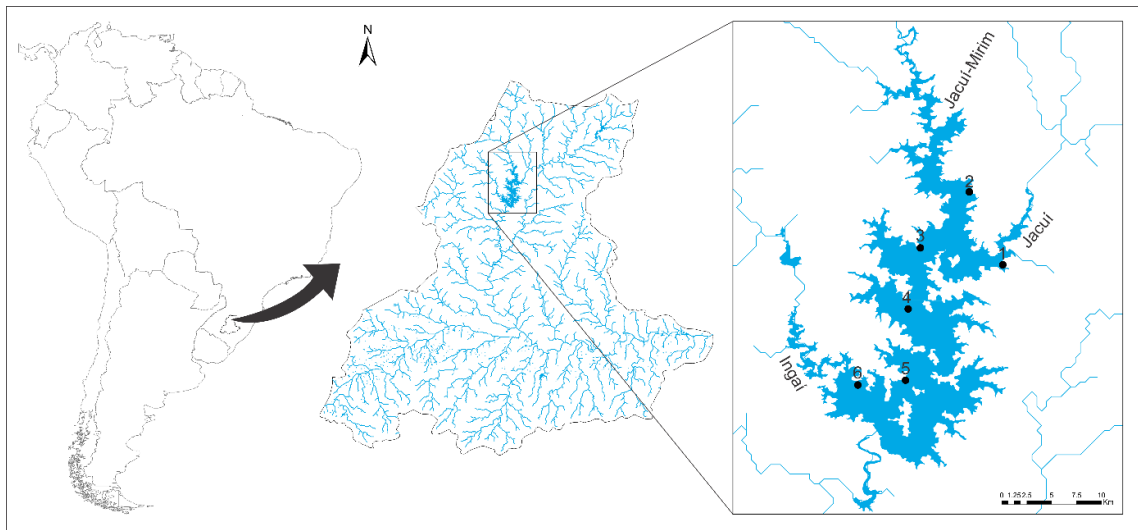


Fonte: Ziani et al. (2017).

lho e a distribuição de chuvas favorecem a ocupação agrícola. Para este estudo, ao longo do reservatório, foram definidos seis pontos amostrais (Figura 1.5, círculos preenchidos) (ponto 1: -28.872252,-53.081407; ponto 2: -28.809629,-53.110312; ponto 3: -28.857732,-53.152414; ponto 4: -28.910295,-53.162816; ponto 5: -28.971537,-53.165079; ponto 6: -28.975587,-53.206198). A distância em linha reta entre os pontos são: 1 ao 2 (7,5 km), 2 ao 3 (6 km), 3 ao 4 (5,9 km), 4 ao 5 (6,8 km), 5 ao 6 (4 km), sendo a distância entre o ponto 2 e 6 a maior de todas (20,7 km). A descrição das características de cada ponto amostral encontra-se na legenda da Figura 1.6.

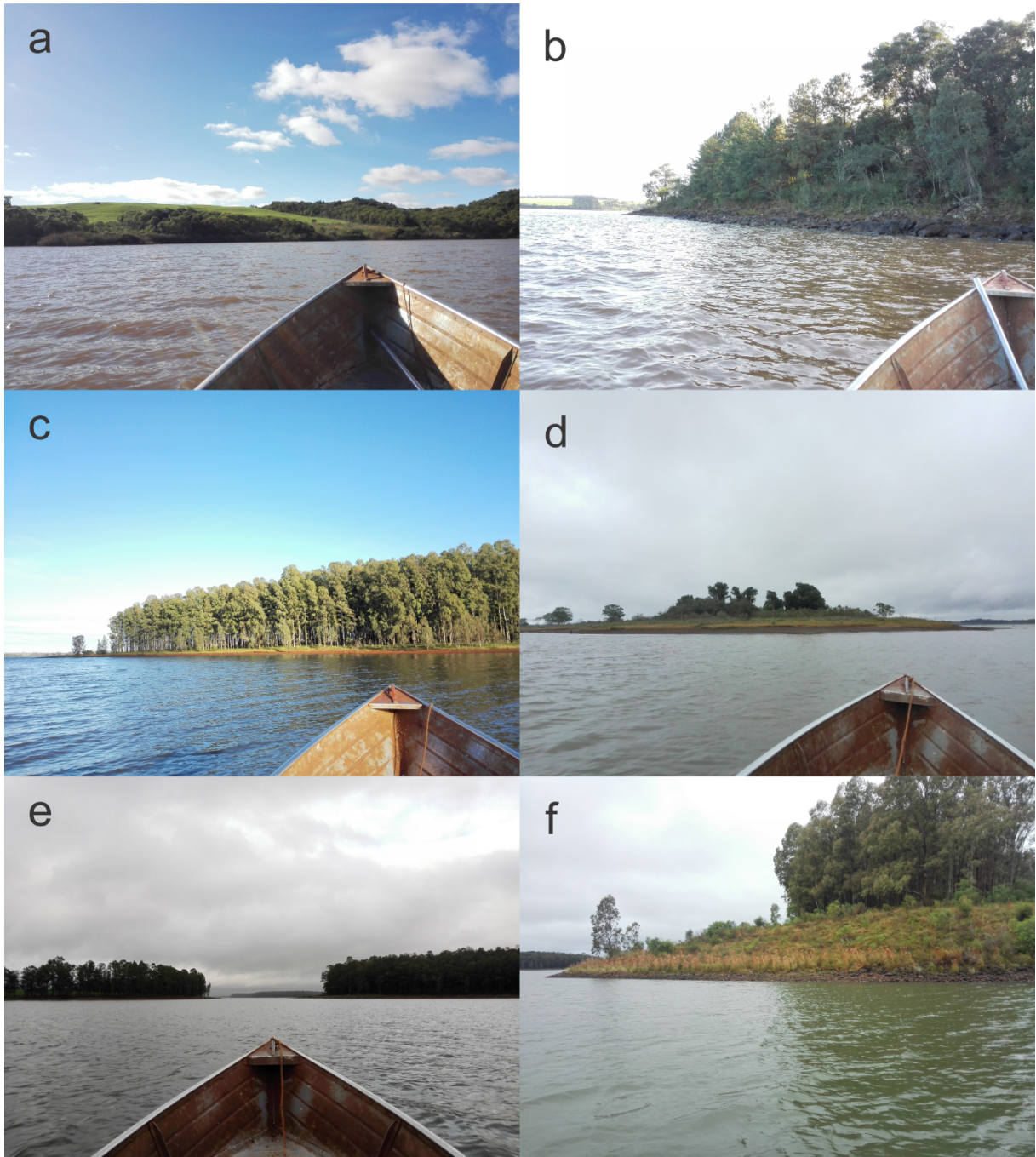
Desta forma, uma vez que a economia do Estado do Rio Grande do Sul baseia-se essencialmente em atividades agrícolas com rotação de cultura e a região da bacia do Alto Jacuí apresenta elevado consumo de pesticidas somado a presença do maior reservatório de água doce artificial do Estado, este estudo analisou a influência de variáveis ambientais sob biomarcadores de toxicidade em duas espécies de peixes que apresentam nichos diferentes e são comumente encontrados no reservatório Passo Real.

Figura 1.5 – Bacia hidrográfica do Alto Jacuí, localizada na região centro-norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Em destaque o reservatório Passo Real e os principais rios formadores.



Fonte: Autora.

Figura 1.6 – Características dos seis locais de coleta no reservatório Passo Real, bacia hidrográfica do Alto Jacuí, RS, Brasil. (a) Ponto 1 - Vegetação ripária rara, com cultivo nas áreas ao redor; (b) Ponto 2 - Vegetação ripária escassa, com substrato pedregoso; (c) Ponto 3 - Cultivo de eucalipto; (d) Ponto 4 - Vegetação ripária moderada; (e) Ponto 5 - Cultivo de eucalipto entre ilhas, com cultivo nas áreas ao redor; (f) Ponto 6 - Vegetação ripária rara, com cultivo de eucalipto.



Fonte: Autora.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo Geral

Verificar sazonalmente os fatores relacionados às alterações bioquímicas, em especial estresse oxidativo, em *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) e *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) em um reservatório subtropical no sul do Brasil.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

- Investigar as respostas dos biomarcadores de toxicidade em *L. anus* nas estações de maiores amplitudes térmicas (verão e inverno).
- Verificar sazonalmente a relação entre variáveis abióticas/bioquímicas em *L. anus* e *G. brasiliensis*.

## 1.5 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

O restante desta tese está estruturado da seguinte forma:

O Capítulo 2 apresenta o artigo já publicado “Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir”; O Capítulo 3 traz o manuscrito “Integrated response of the seasonal variability of abiotic factors and biochemical biomarkers in two species of fish from a subtropical reservoir in southern Brazil”; O Capítulo 4 apresenta a discussão geral da tese e, finalmente, no Capítulo 5 são feitas as considerações finais sobre o trabalho.

## 2 ARTIGO 1

*Este capítulo apresenta o artigo intitulado “Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir” publicado em 2018 na revista *Chemosphere*, em seu volume 191. Neste artigo dados bioquímicos de *L. anus* de verão e inverno foram comparados através de uma ANOVA de 2 vias.*

---

### **Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir**

*Aline Monique Blank do Amaral<sup>a,b</sup>, Jeane de Lima Costa Gomes<sup>b</sup>, Gustavo Henrique Weimer<sup>b</sup>, Aline Teixeira Marins<sup>a,b</sup>, Vania Lucia Loro<sup>a,b</sup>, Renato Zanella<sup>c</sup>*

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, RS, CEP: 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Toxicologia Aquática, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, RS, CEP: 97105-900, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

#### HIGHLIGHTS

Toxicological biomarkers were evaluated in a native fish species *in situ*.

Liver showed oxidative damage in winter and for gills changes were recorded in summer.

Brain and muscle AChE, associated with oxidative damage, increased in winter.

#### ABSTRACT

Cropping systems based on intensive land use and continuous application of agricultural chemicals inflict a threat to aquatic organisms since these substances will inevitably be carried in to water bodies where they can accumulate, particularly in lentic sites. Pesticides exposure in aquatic animals can cause changes that can be quantified through biomarkers. Thus, this study aimed to investigate the effects of season on oxidative stress and neurotoxicity biomarkers in *Loricariichthys anus* from a subtropical reservoir surrounded by agricultural areas in southern Brazil. Ten armored catfish were collected from six sites in February and August 2016. Pesticides present in the water, sediment and muscle were identified and quantified. No pesticides were detected either in sediment nor in muscle. During the winter, the water contained atrazine,



imidacloprid, simazine, azoxystrobin, and propoxur; however, in summer, only atrazine was present in the water. In the winter, there was an increase in the hepatic GST activity and in GPx that kept lipid peroxidation (TBARS) constant and, in the summer, there was an increase in metallothioneins levels. In the gills, variables related to summer were possibly responsible for the elevation of GST, GPx and TBARS; during the winter, there was greater carbonylation of proteins. In the winter, the increased AChE activity in brain and muscle tissue was related to carbonylation of proteins in brain. Although the amount of pesticides detected in the water was low, chronic exposure in addition to environmental variations can cause direct and indirect effects on *L. anus* population.

## KEYWORDS

Oxidative stress, Fish, Biomonitoring, Seasonality

## 2.1 INTRODUCTION

Limnic environments are one of the most threatened ecosystems globally even though they comprise only 0.01% of the total waters (Dudgeon et al., 2006). Their greater vulnerability is due to the position they occupy in the landscape, becoming natural receptors of materials, especially those from anthropic sources (Vörösmarty et al., 2010). Although Brazil has one of the largest hydrographic networks in the world, comprising 12% of the world's freshwater, the overwhelming majority of its water bodies suffer from anthropic stress. Emphasis is given to the inappropriate use of pesticides throughout the entire agricultural production process (ANA, 2012). Most pesticides, regardless of their application mode, reach the soil and waters of adjacent areas by surface runoff and leaching (Tomita and Beyruth, 2002; Silva and Fay, 2004).

In recent years, the Brazilian market for agricultural inputs has grown by 190%, surpassing the United States. Brazil is considered to be the largest consumer of pesticides in the world (Albuquerque et al., 2016). In addition to this problem, the planting system employed in Brazil is based on intensive land use with crop rotation throughout the year to increase production. Thus, pesticides of different groups - herbicides, insecticides, fungicides or those with a broad-spectrum applicability (e.g., imidacloprid) - are used successively and without interruption (Bortoluzzi et al., 2006).

Therefore, a mixture of substances can reach aquatic ecosystems periodically and in varying concentrations. In lotic environments, due to the constant water flow, there is no tendency for accumulation of these xenobiotics and the development of their adverse effects. However, when a lotic environment is transformed into a lentic environment, as is the case of reservoirs, it loses its dilution capacity and increases the retention of pollutants (Urbaniak et al.,

2010; Palanques et al., 2014).

Organisms that inhabit dammed sites are repeatedly exposed and may present disturbances in their metabolism with fluctuations in the redox state. These toxic-induced changes, called biomarkers, may reflect changes occurring at a molecular, cellular, physiological and behavioral level (Monserrat et al., 2003). Biomarkers generally detect early signs of biota disturbances and can demonstrate integrated responses to complex mixtures of pollutants, even at concentrations undetectable by analytical methods (Ghisi et al., 2014). However, abiotic factors may also affect biomarker responses far beyond the influence of pollution (Stoliar and Lushchak, 2012). For instance, the variation in water temperature directly affects oxygen consumption, the activity of enzymes, and the distribution of toxic substances to tissues (Lushchak and Bagnyukova, 2006).

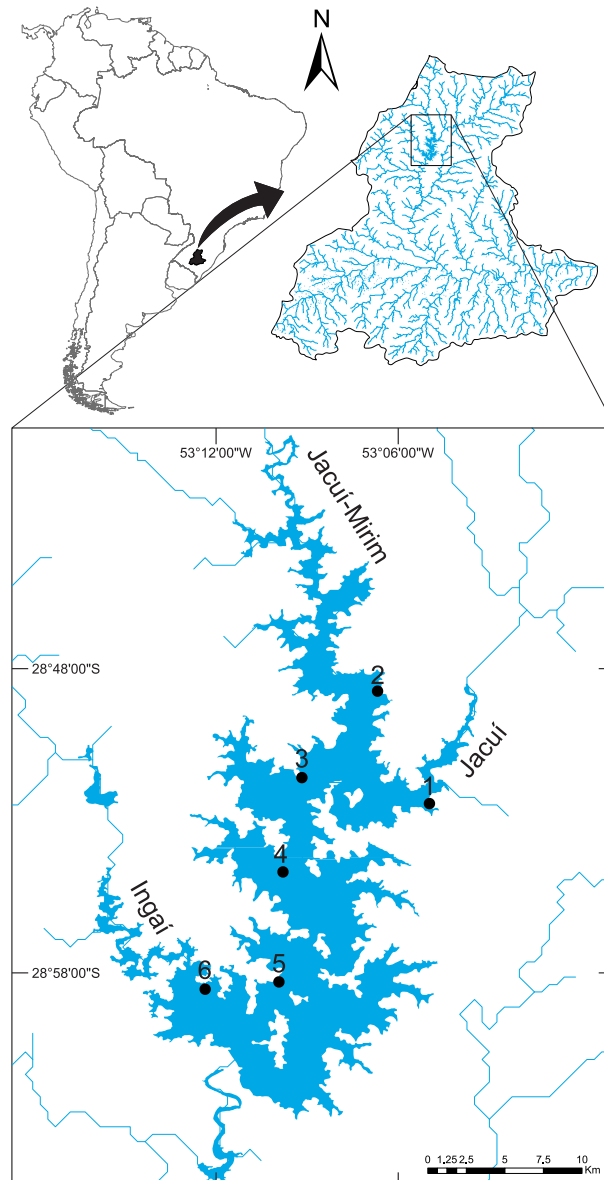
Toxicity biomarkers have been widely used in studies of fish exposed to pollutant (Brito et al., 2012; Sakuragui et al., 2013; Ghisi et al., 2014; Osorio et al., 2014; Loro et al., 2015; Yamamoto et al., 2016; Vieira et al., 2017). Exposure of fish to pollutants can result in some biochemical consequences which include, the direct production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion caused by the herbicide paraquat or hydroxyl radicals caused by the reaction of transition metals with hydrogen peroxide (Fenton reaction). This may lead to increased ROS production during the biotransformation of the pollutant into a more hydrophilic product (e.g. atrazine), inactivation of enzymes that scavenge ROS (e.g. aminotriazole and dithiocarbamates), or altered activity of acetylcholinesterase (AChE) which is responsible for termination of nerve impulse transmission in cholinergic neurons (e.g. organophosphates and carbamates) (Lushchak, 2016). Fish have the potential to be good bioindicators, as they are easy to collect, have a long lifespan; and can be sampled throughout the year, consequently enabling the evaluation of seasonal changes and providing a temporal record of contaminant exposure (Jaramillo-Villa and Caramaschi, 2008). *Loricariichthys anus* (Siluriformes: Loricariidae) is a benthic species that has an omnivorous habit and is distributed in coastal rivers of southern Brazil, from the Uruguay and lower Paraná River basin (Reis and Pereira, 2000). Fish of the genus *Loricariichthys* are recognized to be mouthbrooders, where males show a hypertrophied development of the lips for incubating eggs during the warm breeding season. A modification of the mouth, a sucker disk, enables them to adhere to the substrate where they can scrape algae, small invertebrates, and detritus (Reis et al., 2003; Covain and Fisch-Muller, 2007). Family Loricariidae could be considered as a model for ecotoxicological studies, as they can interact with xenobiotics in both the water column and the sediment.

Therefore, this study aims to investigate the effects of seasonality on oxidative stress and neurotoxicity biomarkers in *L. anus* in a subtropical reservoir in southern Brazil and to evaluate the potential risks of environmental pollutants to the aquatic ecosystem of the reservoir.

## 2.2 MATERIAL AND METHODS

Adults of *L. anus* of both sexes were collected in six sites ( $n = 10$  each site and season) distributed up to downstream of Passo Real Reservoir, Rio Grande do Sul, Brazil in summer (February 2016) (weight:  $64 \pm 8$ g; length:  $24 \pm 1$ cm) and winter (August 2016) (weight:  $62 \pm 6$ g; length:  $24 \pm 1$ cm) (Fig. 2.1). Passo Real presents  $233.39 \text{ km}^2$  of surface area,  $3,671 \text{ km}^3$  of volume, and 610 km of perimeter being the second of the cascading reservoirs along the Jacuí River for power generation purposes (CEEE-GT, 2011).

Figura 2.1 – Location of the sampling sites in Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil. The reservoir is supplied by Jacuí, Jacuí-Mirim and Ingaí rivers. All sites are somehow near agricultural areas. Some individual characteristics of the six sampling sites: 1 – Scarce riparian vegetation; 2 – Scarce riparian vegetation, stony substrate; 3 – Eucalyptus culture; 4 – Moderate riparian vegetation; 5 – Eucalyptus culture between "islands"; 6 – Scarce riparian vegetation and Eucalyptus culture.



The Basin where the reservoir is inserted was originally occupied by Mixed Ombrophilous Forest (Araucaria Forest), Deciduous Forest and Savanna (Grasslands). Over the years, its physiognomy has been intensively modified by agriculture (Table 2.1) and livestock farming with intermittent application of pesticides (approximately 9 liters per hectare per year) (SES, 2010; Barreto et al., 2012).

Tabela 2.1 – Common crops in the surrounding areas of Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil and the months of planting (P) and harvesting (H).

	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Soy			H								P	
Wheat						P				H		
Maize	H								P			
Canola					P				H			

The fish were collected with gillnets (Mesh 5, 25 mm between nodes) placed with a motor boat in the water late in the afternoon and collected early in the morning (according to SISBIO license 52097-2). After euthanasia, through spinal cord section, they were stored in thermal ice boxes. Liver, gills, brain, and muscle were dissected and stored in liquid nitrogen for further biochemical analysis.

At the sampling sites, water parameters (temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity, oxidation/reduction potential, turbidity, total dissolved solids) were measured using a Horiba® U-52 probe. Samples of surface water and sediment with Ekman's Dredge were collected. In water samples, the concentration of ammonia (expressed in  $\mu\text{mol ammonia}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and nitrite (expressed in  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were quantified (Verdouw et al., 1978). Pesticides in the water and sediment were discriminated and quantified ((LARP-UFSM) according to the methodologies described in Sabin et al. (2009) and Martins et al. (2013)). In this same laboratory, pesticides were also quantified in the fish muscles, according to the methodology described in Munaretto et al. (2013).

### 2.2.1 Biochemical Analyses

Liver, gills, brain and muscle were homogenized with Tris-HCl 50 mM pH 7.5 buffer according to prior standardization of the assay and centrifuged at 1400 g for 10 minutes and the supernatant was used for the analysis (except for hepatic metallothioneins assay, in which was used Tris-HCl 0.02 M pH 8.6 + PMSF 0.0005 M + 0.01%  $\beta$ -mercaptoethanol). The protein concentration was determined according to Bradford (1976) expressed as  $\text{mg}$  of protein $\cdot\text{mL}^{-1}$ . The biochemical analyses were adapted to microplate reader (except catalase and metallothioneins). Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured according to Habig et al. (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, expressed as  $\mu\text{mol GS-DNB}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$

of protein<sup>-1</sup>. Glutathione-peroxidase (GPx) activity through the oxidation of NADPH in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as described by Paglia and Valentine (1967) expressed as nmol·min<sup>-1</sup>·mg of protein<sup>-1</sup>. Catalase activity on liver (CAT) was determined according to Aebi (1984) by the principle of the decrease of hydrogen peroxide absorbance by the metabolism of this by catalase, being expressed as μmol·min<sup>-1</sup>·mg of protein<sup>-1</sup>. Hepatic metallothioneins concentration (MT) was measured according to Viarengo et al. (1997) and expressed as μmol of SH·g of tissue<sup>-1</sup>. The acetylcholinesterase activity (AChE) was assessed as described by Ellman et al. (1961) with some modifications and expressed as μmol·min<sup>-1</sup>·mg of protein<sup>-1</sup>.

In relation to the oxidative damage, lipid peroxidation was assessed by the quantification of malondialdehyde (MDA), one of its end products, through TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) according to Draper and Hadley (1990), expressed as nmol of MDA·g of tissue<sup>-1</sup>. The carbonyl protein content (CP) was analyzed as described by Yan et al. (1995), expressed as nmol of carbonil protein·mg of protein<sup>-1</sup>.

### 2.2.2 Statistics

The data obtained in the toxicity analyzes at the different sampling sites was tested for normality by Kolmogorov-Smirnov test and homogeneity by Levene test. A two-way ANOVA (expressed as mean ± standard deviation) was used to verify the influence of seasonality in relation to the biochemical responses, using seasons and sites as factors, with Tukey' post-test. All data were analyzed using GraphPad Prism 6. Results were considered significant at  $p \leq 0.05$ . The data shown in the graphs represent mean ± standard deviation.

## 2.3 RESULTS

### 2.3.1 Abiotic Factors

According to INMET (2017), considering data from Iburubá Station (about 20 km from S2), in the summer of 2016 (between December and prior to sampling) the total rainfall was 424 mm, with the highest daily rainfall of 41 mm occurring in the middle of February. In the winter, the highest daily rainfall was recorded in July (59 mm) and total rainfall was 360 mm. Air temperature in the summer was between 17 °C and 32 °C and in the winter between 2 °C and 18 °C. Physical-chemical variables verified at the six sampling sites in different seasons are shown in Table 2.2. In the summer, at the most upstream site, the concentrations of ammonia and nitrite were higher than at other sites, reflecting the proximity of this site to mid-sized cities and the low volume of rainfall before sampling. In the winter, there was a decreasing

gradient of turbidity, probably due to precipitation on the day before sampling. According to current Brazilian legislation on the quality of freshwater (CONAMA, 2005), and based on class I classification (for human consumption after simplified treatment), most abiotic values were within the reference values. For instance, dissolved oxygen should not be below 6 mg·L<sup>-1</sup> and pH must be between 6 and 9. Turbidity was above the permitted levels at some points possibly due to rain or the amount of organic matter.

Tabela 2.2 – Abiotic data from the six sites at different seasons at Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil. DO: dissolved oxygen (mg·L<sup>-1</sup>); EC: electric conductivity (mS·cm<sup>-1</sup>); ORP: oxidation reduction potential (mV); NTU: turbidity; TDS: total dissolved solids (g·L<sup>-1</sup>); Am: ammonia (μmol·mL<sup>-1</sup>); Nit: nitrite (mg·mL<sup>-1</sup>).

	Summer						Winter					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S1	S2	S3	S4	S5	S6
T °C	27.7	27.6	27.0	30.2	28.6	32.2	17.0	16.1	15.8	15.9	16.4	15.6
pH	6.9	6.3	7.2	8.8	7.6	8.1	6.9	6.9	6.7	6.5	6.4	6.0
DO	12.1	10.4	12.3	12.6	10.9	9.4	12.3	11.4	11.6	14.7	14.3	13.4
EC	0.053	0.049	0.052	0.053	0.049	0.047	0.052	0.045	0.048	0.048	0.047	0.044
ORP	299	337	291	236	279	250	300	306	330	332	319	339
NTU	49.8	46.1	24.2	25.3	9.5	91.7	73.0	52.4	29.2	27.1	21.2	16.5
TDS	0.035	0.032	0.034	0.035	0.032	0.031	0.034	0.029	0.031	0.031	0.031	0.029
Nit	0.0138	0.0037	0.0049	0.0058	0.0055	0.0031	0.0036	0.0017	0.0031	0.0042	0.0072	0.0062
Am	0.0139	0.0017	0.0011	0.0033	0.0039	0.0039	0.0145	0.0213	0.0175	0.0145	0.0039	0.0037

The pesticides present in the water are shown in Table 2.3. No pesticides were detected in the sediment or in muscle of *L. anus* (for the complete list of pesticides residues analyzed, see supplementary material). Of the pesticides detected, only atrazine and simazine are included in Brazilian legislation (up to 2 μg·L<sup>-1</sup> for class I).

### 2.3.2 Biomarkers

In the liver, the protein concentration (Fig. 2.2a) was almost two-fold higher in the summer than in the winter for all sampling sites. GST had higher activity in the winter at all sites (Fig. 2.2b). The activity of GPx (Fig. 2.2c) was higher in the winter at sites 2, 4, 5, 6. There was an increase in catalase activity (Fig. 2.2d) in the winter only at the downstream sites (4 and 6). Metallothioneins levels (Fig. 2.2e) were significantly increased at sites 2, 4, 5, 6 in the summer, and at site 4 the levels were almost six-fold higher than in the winter. There was difference in the amount of TBA-reactive substances between seasons (Fig. 2.2f). The amount of carbonyl proteins (CP) (Fig. 2.2g) was higher at downstream site (6) in the winter.

In the gills, the protein concentration (Fig. 2.3a) was higher at sites 1, 3 and 5 in the winter. GST activity (Fig. 2.3b) increased in the summer at sites 1 and 5. The increase in GPx

Tabela 2.3 – Pesticides found in the water ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) from the six sampling sites at different seasons at Passo Real reservoir, Upper Jacuí Hydrographic Basin, RS, Brazil. Determination of pesticide residues using SPE and LC-MS/MS analysis. LOQ: quantification limit. (\* < LOQ). LOD and LOQ values for summer: 0.04 and 0.13; LOD and LOQ values for winter: 0.006 and 0.02. Complete pesticide multi-residue analysis table available in supplementary material.

		Atrazine Herbicide Triazine	Imidacloprid Inseticid Neonicotinoid	Simazine Herbicide Triazine	Azoxystrobine Fungicid Strobilurin	Propoxur Inseticid Carbamate
Summer	S1	0.51				
	S2	0.56				
	S3	0.41				
	S4	0.23				
	S5	0.25				
	S6	0.21				
Winter	S1	0.03	0.02			0.02
	S2	0.02	0.03			*
	S3	0.03	0.02	*	*	*
	S4	0.02	0.04		*	*
	S5	0.03	*	*	*	*
	S6	0.03		*	*	*

activity was significant (Fig. 2.3c) in the summer for all sites. TBARS (Fig. 2.3d) showed a significant increase in the summer, except for site 1 (inverse response). PC was higher (Fig. 2.3e) in the winter and was demonstrated only at the middle sites (3, 4).

In the brain, there was no significant difference in protein concentration between summer and winter (data not shown). GST activity showed no difference between seasons (Fig. 2.4a). AChE activity (Fig. 2.4b) was almost two-fold higher at some sites in the winter (sites 1, 2 and 3). TBARS increased (Fig. 2.4c) significantly in the summer at sites 5 and 6, and there was no clear difference between seasons for the other sites. Carbonylation of proteins was higher (Fig. 2.4d) in the winter at site 2.

Similar results for the brain, muscle protein concentration showed no significant difference between summer and winter (data not shown). The higher GST activity in muscle (Fig. 2.5a) was observed in the winter at sites 4 and 6. AChE was increased four-fold (Fig. 2.5b) in the winter at sites 3 and 4 and also increased at sites 1 and 5. The amount of TBARS was higher (Fig. 2.5c) during winter at all sites. Higher carbonyl protein (Fig. 2.5d) were evident in the winter only at site 1.

Figura 2.2 – Liver biochemical analysis in summer and winter: (a) protein concentration, (b) activity of GST, (c) activity of GPx, (d) activity of CAT, (e) metallothioneins concentration, (f) amount of TBA-reactive substances, (g) carbonyl proteins. \* represents statistical difference between seasons ( $p \pm 0.05$ ).

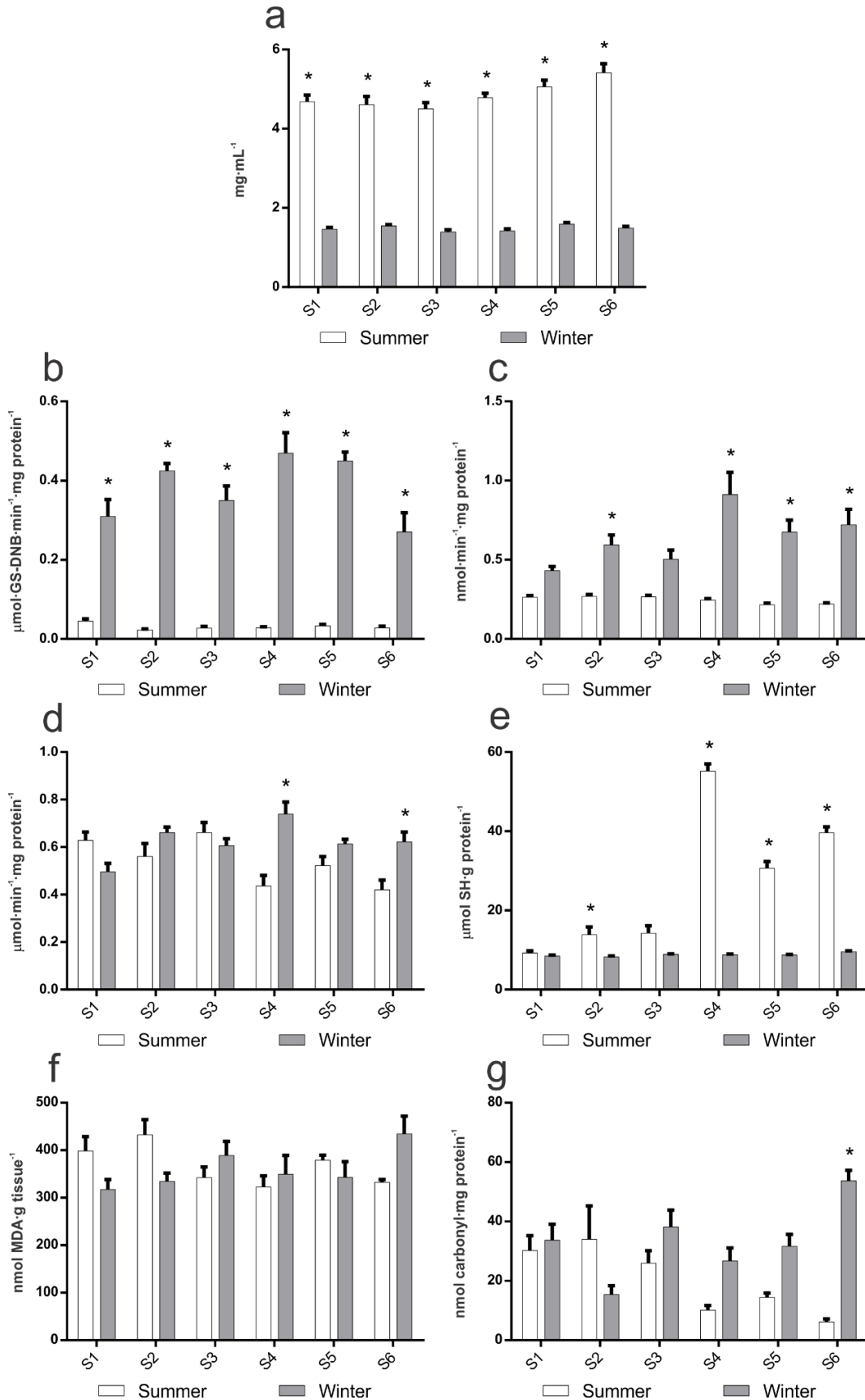




Figura 2.3 – Gills biochemical analysis in summer and winter: (a) protein concentration, (b) activity of GST, (c) activity of GPx, (d) amount of TBA-reactive substances, (e) carbonyl proteins. \* represents statistical difference between seasons ( $p \pm 0.05$ ).

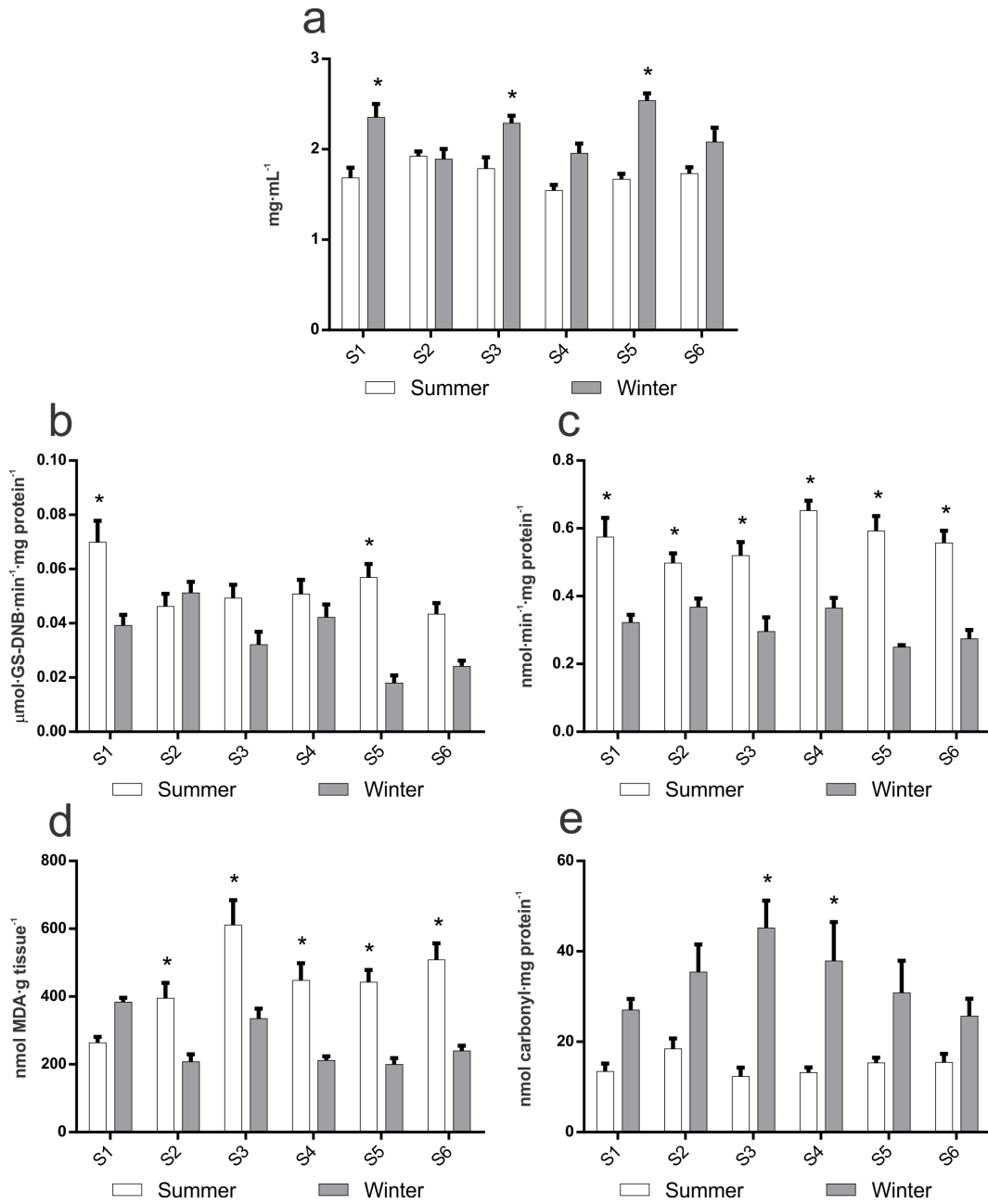


Figura 2.4 – Brain biochemical analysis in summer and winter: (a) activity of GST, (b) activity of AChE, (c) amount of TBA-reactive substances, (d) carbonyl proteins. \* represents statistical difference between seasons ( $p \pm 0.05$ ).

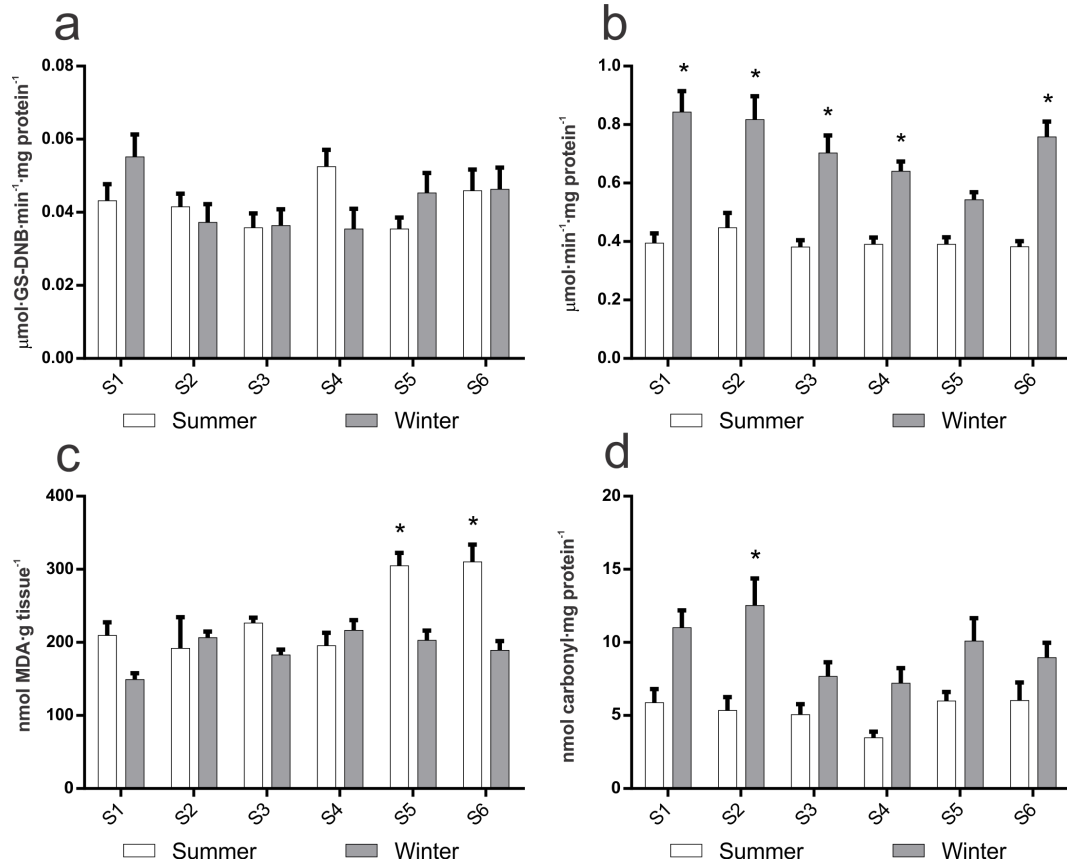
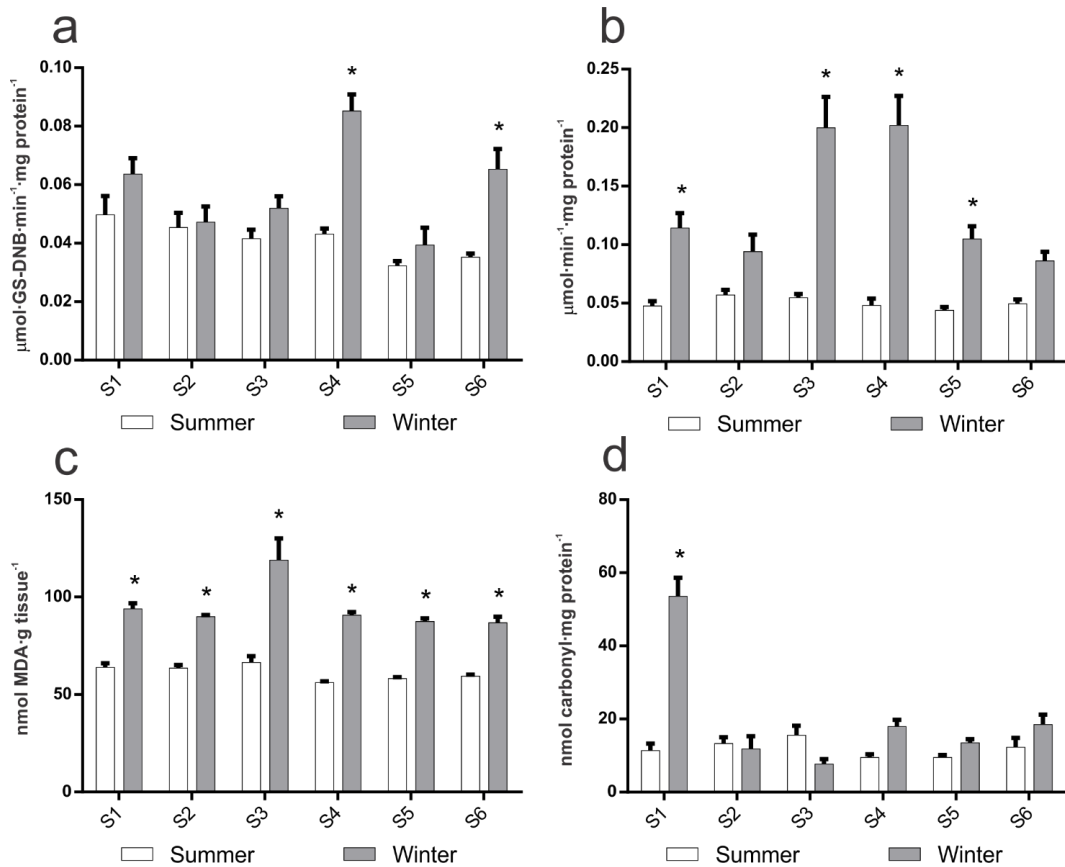


Figura 2.5 – Muscle biochemical analysis in summer and winter: (a) activity of GST, (b) activity of AChE, (c) amount of TBA-reactive substances, (d) carbonyl proteins. \* represents statistical difference between seasons ( $p \pm 0.05$ ).



## 2.4 DISCUSSION

Since fish are ectothermic organisms, all of their metabolic processes are directly related to water temperature (Lushchak and Bagnyukova, 2006; Dalzochio and Gehlen, 2016) and the presence of pollutants could interfere with normal fluctuations of metabolism related to seasonality.

Although the amount of pesticides detected in the water samples was low, it is important to note that these products are used intermittently in several crops throughout the year in large areas around the reservoir and the majority are not covered by Brazilian environmental laws. Azoxystrobin is a fungicide that inhibits mitochondrial respiration, causes increased ROS production and can affect aquatic plants and animals (Rodrigues et al., 2013; Han et al., 2016). Atrazine and simazine are generally applied in combination to increase their herbicidal effects. In addition, atrazine may influence the reproductive development of aquatic organisms, and the relatively long aquatic persistence of this herbicide may cause a decline in the abundance and richness of photosynthetic organisms (Solomon et al., 2008). Propoxur is an insecticide not

approved for application in agricultural areas. Its use is restricted to veterinary and domestic products. However, this insecticide has been detected in concentrations higher than expected in other Brazilian basins, such as the Uruguay Basin (Loro et al., 2015), indicating that propoxur is being used inappropriately in agricultural areas as a pest control.

In this study, during the winter when a greater diversity of pesticides in the water was recorded, there was a substantial increase in liver GST activity in fish. GST is an enzyme belonging to phase II of xenobiotic biotransformation, making substances more hydrophilic and more easily excreted. An increase in CAT activity, a first line antioxidant enzyme, was only recorded in downstream sites; this may be due to increased pesticide residues and the accumulation of pollutants from more upstream sites.

The GST activity, together with GPx which hydrolyzes organic peroxides, and CAT (at the downstream sites) were responsible for keeping liver levels of TBARS levels constant. Elevation of GST in winter could also be related to the transport of sex hormones in the pre-reproductive period (reproduction of *L. anus* occurs between spring and summer), as reported by Zhou et al. (2009). The large variation in the liver content of proteins between the different seasons reported in the present study could be due to the higher synthesis of hepatic proteins during the summer, as shown by Sáez et al. (1984). In relation to carbonyl proteins, the increase recorded was only at site 6, however is impossible related it only to pesticides found in water, is more feasible that season influence more this parameter as show by Osorio et al. (2014), where winter increase in protein carbonil in *Geophagus brasiliensis* tissues was used as an indicator of water quality in the Tubarao -SC-Brazil river.

Metallothioneins are metalloproteins that bind to essential and non-essential transition metals and prevent them from reacting with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which, via Fenton reaction, could increase the production of highly reactive hydroxyl radicals and lead to oxidative damage. The increase of hepatic metallothioneins levels in the summer in some sites could be associated with the greater contribution of domestic sewage from cities along the reservoir. It is known that heavy metals occur in waste effluent and are also a component of many fertilizers (Sakuragui et al., 2013).

It appears that summer-related variables (increased water temperature, lower rainfall volume, higher contribution of domestic sewage, or higher concentration of atrazine) caused disturbances in *L. anus* gills leading to increased activity of GPx, GST and consequently, TBARS. According to data from the literature and corroborating the results obtained in the present study, gills are in permanent contact with the environment, making them vulnerable to seasonal variations in temperature and dissolved oxygen, sewage, and pesticide loads (Wilhelm Filho et al., 2005; Lushchak and Bagnyukova, 2006; Ghisi et al., 2014).

The increase of the carbonyl protein from gills in winter may be related to the pesticide load found in the water. It is possible that protein damage was caused by other lipid peroxidation products not measured in this study, such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) or by direct reaction with ROS such as hydroxyl radicals, as suggested by Berlett and Stadtman (1997).

Many pesticides are known to cause decreased AChE activity, resulting in accumulation

of acetylcholine in nerve synaptic clefts and leading to muscular and behavioral changes in fish (Lushchak, 2016; Nunes et al., 2017). Although a carbamate was among the pesticides detected in water during the winter, in *L. anus* there was an increase in the activity of AChE together with the carbonylation of proteins in brain. In the muscle, the increase in AChE was followed by an increase in TBARS levels. The observed changes in the carbonyl protein in the brain and the increase in lipid peroxidation in muscle may have influenced the increase in AChE activity, showing a compensatory response to oxidative damage probably caused by pesticides found in the water.

Generally the activity of AChE increases with temperature, as seen in *Morone saxatilis* (Durieux et al., 2011). However, imidacloprid, an insecticide widely used in agricultural areas, was able to bioaccumulate in all tissues (brain, muscle, gills, liver and blood) of *Australoheros facetus*. The authors pointed out the risk of imidacloprid because this compound was overpassing the brain-blood barrier (Iturburu et al., 2016). In addition, imidacloprid also caused increased AChE activity in invertebrates acting as a neurotoxic agonist (Boily et al., 2013). The presence of imidacloprid in the reservoir may have influenced the increase in AChE activity. However, laboratory tests demonstrating the interaction of this enzyme with imidacloprid should be performed to verify this hypothesis. In addition to pesticides, the reservoir receives substantial quantities of domestic and industrial sewage through its tributaries as demonstrated by the high levels of ammonia at site 1 during summer. Large contributions of nutrients from the sewage can cause eutrophication and explosive growth of algae that can cause decline in dissolved oxygen or release of toxins harmful to other organisms (Monserrat et al., 2007). In addition, industrial waste can contain a range of toxic substances, such as hydrocarbons and surfactants that may have adverse effects and heavy metals that accumulate in tissues.

Thus, freshwater environments are highly vulnerable to pollution since they act as a sink for many environmental contaminants. These toxins, although they do not often cause serious short-term effects, may interfere with ecological processes in the continuous long-term exposure (Gibbons et al., 2015; Hamilton et al., 2015). Given that *L. anus* is an omnivorous species, the decrease in the richness and abundance of photosynthetic organisms and primary consumers may be an indirect effect of pollution. In an outdoor water microcosm exposed to azoxystrobin, Gustafsson et al. (2010) demonstrated that the population structure of the zooplankton, phytoplankton and primary consumers was altered by this fungicide.

Direct effects would cause a decrease in the fitness of the *L. anus* population through behavioral changes which alter the reproductive or foraging capacity (e.g. the observed alterations in AChE levels), metabolic energy deviations due to increased synthesis of antioxidants (e.g. increased ROS production in response to pollutants) that could increase vulnerability to parasites and diseases (Kime, 1995; Austin, 1999; Scott and Sloman, 2004). Thus, the use of biomarkers in aquatic sites with intense agricultural activity allows intervention and remediation before the harmful effects of pollution on the aquatic population become irreversible and the integrity of the ecosystem is affected as a whole.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by the Brazilian government through CAPES foundation (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). We also thank Adelar Feder, Jonatan Neske Blank, MSc. Tiago da Luz Fiuza, MSc. Renan Duarte, Dr. Bernardo Baldisserotto for the technical support. Vania Lucia Loro received research fellowship: reference number: 312983/2013-1 from CNPq (National Research Council). Aline M. Blank do Amaral also received a doctor fellowship from CAPES.

## REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Albuquerque, A.F., Ribeiro, J.S., Kummrow, F., Nogueira, A.J., Montagner, C.C., Umbuzeiro, G.A., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci. Process Impacts* 18, 779-787.
- Agência Nacional de Águas (ANA), 2012. Overview of Surface Water Quality in Brazil/2012. Brazilian Government, Brasilia.
- Austin, B., 1999. The effects of pollution on fish health. *J. Appl. Microbiol.* 85, 234-242.
- Barreto, S., Herman, L., Garibotti, V., 2012. Levantamento dos agroquímicos usados no Estado do Rio Grande do Sul por Bacia Hidrográfica. *Bol. Epidemiol.* 14, 3-6.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.
- Bortoluzzi, E.C., Rheinheimer, D. dos S., Gonçalves, C.S., Pellegrini, J.B.R., Zanella, R., Coppetti, A.C.C., 2006. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* 10, 881-887.
- Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P., Chagnon, M., 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 5603-5614.
- Bradford, M.M., 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.

Brito, I. de A., Freire, C.A., Yamamoto, F.Y., De Assis, H.C.S., Souza-Bastos, L.R., Cestari, M.M., Ghisi, N. de C., Prodocimo, V., Neto, F.F., Ribeiro, C.A. de O., 2012. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multibiomarker evaluation in tropical fish. *J. Environ. Monit.* 14, 615-625.

Companhia Estadual de Geração e Transmissão de Energia Elétrica (CEEE-GT), 2011. Plan of Use and Occupation of the Land Surrounding the Reservoir of UHE Passo Real. Profill, Porto Alegre.

Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente (CONAMA), 2005. Resolução N° 357 de 17 de março de.

Covain, R., Fisch-Muller, S., 2007. The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa* 1462, 1-40.

Dalzochio, T., Gehlen, G., 2016. Confounding factors in biomonitoring using fish. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 11, 53-61.

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

Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A., Soto, D., Stiassny, M.L., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 81, 163-182.

Durieux, E.D., Farver, T.B., Fitzgerald, P.S., Eder, K.J., Ostrach, D.J., 2011. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish. Physiol. Biochem.* 37, 21-29.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

Ghisi, N. de C., De Oliveira, E.C., Fávoro, L.F., De Assis, H.C.S., Prioli, A.J., 2014. In situ assessment of a Neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93, 699-709.

Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 103-118.

Gustafsson, K., Blidberg, E., Elfgrén, I.K., Hellström, A., Kylin, H., Gorokhova, E., 2010. Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms. *Ecotoxicology* 19, 431-444.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Hamilton, P.B., Cowx, I.G., Oleksiak, M.F., Griffiths, A.M., Grahn, M., Stevens, J.R., Carvalho, G.R., Nicol, E., Tyler, C.R., 2015. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals e a critical review. *Fish. Fish.* 17, 545-566.

Han, Y., Liu, T., Wang, J., Wang, J., Zhang, C., Zhu, L., 2016. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 13-19.

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 2017. Rede de Estações. <http://www.inmet.gov.br> (Accessed June 2017).

Iturburu, F.G., Zömisch, M., Panzeri, A.M., Crupkin, A.C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Menone, M.L., 2016. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 699-708.

Jaramillo-Villa, U., Caramaschi, E.P., 2008. Índices de integridade biótica usando peixes de água doce: uso nas regiões tropical e subtropical. *Oecol. Bras.* 12, 442-462.

Kime, D.E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 5, 52-96.

Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Costa, M., Perazzo, G.X., 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.

Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711-747.

Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143, 36-41.

Martins, M.L., Donato, F.F., Prestes, O.D., Adaime, M.B., Zanella, R., 2013. Determination of pesticide residues and related compounds in water and industrial effluent by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadruple mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 7697-7709.

Monserrat, J.M., Monserrat, L.A.G., Bianchini, A., 2003. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments Toxicol.* 9, 255-259.



Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M., Pinho, G.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 221-234.

Munaretto, J.S., Ferronato, G., Ribeiro, L.C., Martins, M.L., Adaime, M.B., Zanella, R., 2013. Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta* 116, 827e834.

Nunes, M.E., Müller, T.E., Braga, M.M., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Marins, A., Rodrigues, C., Menezes, C., Rosemberg, D.B., Loro, V.L., 2017. Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish. *Mol. Neurobiol.* 54, 3925-3934.

Osorio, F.H., Silva, L.F., Piancini, L.D., Azevedo, A.C., Liebel, S., Yamamoto, F.Y., Philippi, V.P., Oliveira, M.L., Ortolani-Machado, C.F., Neto, F.F., Cestari, M.M., De Assis, H.C. da S., de Oliveira Ribeiro, C.A., 2014. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 9145-9160.

Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-169.

Palanques, A., Grimalt, J., Belzunces, M., Estrada, F., Puig, P., Guillen, J., 2014. Massive accumulation of highly polluted sedimentary deposits by river damming. *Sci. Total Environ.* 497-498, 369-381.

Reis, R.E., Pereira, E.H.L., 2000. Three new species of the Loricariid catfish genus *Loricariichthys* (Teleostei: Siluriformes) from Southern South America. *Copeia* 4, 1029-1047.

Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J., 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre.

Rodrigues, E.T., Lopes, I., Pardal, M.A., 2013. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. *Environ. Int.* 53, 18-28.

Sabin, G.P., Prestes, O.D., Adaime, M.B., Zanella, R., 2009. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 918-925.

Sáez, L., Zuvic, T., Amthauer, R., Rodríguez, E., Krauskopf, M., 1984. Fish liver protein synthesis during cold acclimatization: seasonal changes of the ultrastructure of the carp hepatocyte. *J. Exp. Zool.* 230, 175-186.

Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Pereira, C.D., Carvalho, C.S., Sadauskas-Henrique, H., Fernandes, M.N., 2013. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ. Pollut.* 178, 41-51.

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369-392.

Secretaria Estadual de Saúde (SES), 2010. Survey on the Use and Criticality of Pesticides Used in the State of Rio Grande Do Sul. Final Report. Brazilian Government, Porto Alegre.

Silva, C.M.M. de S., Fay, E.F., 2004. *Agrotóxico e ambiente*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.

Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 721-772.

Stoliar, O.B., Lushchak, V.I., 2012. Environmental pollution and oxidative stress in fish. In: Lushchak, V.I. (Ed.), *Oxidative Stress: Environmental Induction and Dietary Antioxidants*. In Tech, Croatia, pp. 131-166.

Tomita, R.Y., Beyruth, Z., 2002. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico* 64, 135-142.

Urbaniak, M., Skowron, A., Fratzczak, W., Zielinski, M., Wesolowski, W., 2010. Transport of polychlorinated biphenyls in urban cascade reservoirs: levels, sources and correlation to environmental conditions. *Pol. J. Environ. Stud.* 19, 201-211.

Verdouw, H., Van Echteld, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1978. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399-402.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69-84.

Vieira, C.E., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., Martinez, C.B. dos R., 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Sci. Total Environ.* 586, 598-609.

Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555-561.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 244, 349-357.

Yamamoto, F.Y., Pereira, M.V., Lottermann, E., Santos, G.S., Stremel, T.R., Doria, H.B., Gusso-Choueri, P., Campos, S.X., Ortolani-Machado, C.F., Cestari, M.M., Neto, F.F., Azevedo, J.C., Ribeiro, C.A.O., 2016. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçú River (Southern Brazil). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 18111-18128.

Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349-351.

Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., Xu, J., 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and regulation under pH stress. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 150, 224-230.

### 3 ARTIGO 2

*Este capítulo apresenta o artigo intitulado provisoriamente de “Integrated response of the seasonal variability of abiotic factors and biochemical biomarkers in two species of fish from a subtropical reservoir in southern Brazil”, onde dados de biomarcadores de toxicidade de *Loricariichthys anus* e *Geophagus brasiliensis* juntamente com dados ambientais (físico-químicos, pesticidas e metais) foram compilados em uma análise multivariada (RDA). No Apêndice A deste documento encontram-se as planilhas de dados bioquímicos (média de n = 10), físico-químicos, os pesticidas e metais quantificados na água (média de n = 3) utilizados na análise multivariada.*

---

#### **Integrated response of the seasonal variability of abiotic factors and biochemical biomarkers in two species of fish from a subtropical reservoir in southern Brazil**

*Aline Monique Blank do Amaral<sup>a</sup>, Luciana Joner Guerra<sup>b</sup>, Felipe Osmari Cerezer<sup>a</sup>, Renato Zanella<sup>c</sup>, Vania Lucia Loro<sup>a,b</sup>*

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, RS, CEP: 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, RS, CEP: 97105-900, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

#### ABSTRACT

Reservoirs are lentic water bodies man-made by river dam. In these modified freshwater bodies pollutants from adjacent areas can accumulate in both water and sediment. Fish are common organisms in reservoirs, occupying several trophic niches. *Loricariichthys anus* and *Geophagus brasiliensis* and abiotic variables were collected seasonally for one year at six sample sites in the Passo Real reservoir, in a subtropical region in southern Brazil. Biochemical toxicity biomarkers were analyzed in four tissues of both fish as well as metals and pesticides in the water. A redundancy analysis (RDA) was performed to obtain the temporal relationship between the biomarkers and the other environmental variables. RDA clearly showed the separation of the seasons for both species. Among the abiotic variables, ammonia, nitrite, electrical conductivity and temperature were the most important. Azoxystrobin, simazine and propoxur were the pesticides that contributed the most to the variation. Metals such as copper, aluminum and iron had less contribution. Seasonality seems to be the main factor explaining the variability of biomarkers. Thus, it is difficult to separate how fluctuation in biomarkers responses reflects only

the normal state of the organism as a function of seasonality and its biological consequences from the negative effects of exposure of these animals to the various types of pollution (sewage, pesticides, fertilizers) entering this aquatic system.

## KEYWORDS

Oxidative stress, Metallothioneins, RDA, Pesticides, Metals

### 3.1 INTRODUCTION

Brazil presents one of the richest hydrographic systems, comprising about 18% of the surface freshwater of the planet (BRITO et al., 2012). The great majority of Brazilian rivers presents continuous flow, is large and perennial, characteristics that, associated to the relief, stimulate the implantation of dams for electric power generation. Besides the immediate impacts to the local fauna and flora, the construction of hydroelectric plants converts a system naturally lotic into a lentic. The flow of the water course is then regulated, and when its velocity is decreased, organic materials and pollutants are retained and accumulated and when the flow increases, there is the movement of these downstream (PALANQUES et al., 2014).

In the Southern Brazil, whose economy is based mainly on agricultural and livestock activities, there has been an increase in the consumption of chemical products that are used in soil improvement (fertilizers), crop protection and pest control. In some regions, in addition to excessive consumption, reaching, for example, 919 L/km<sup>2</sup> per year (BARRETO et al., 2012), many pesticides are continuously applied to crops throughout the year, especially broad-spectrum products. In addition, the use of fertilizers became indispensable to improve production due to the intensive use of the land. Many of these fertilizers, as well as some pesticides, have heavy metals as impurities (cadmium, cobalt, copper, zinc, lead and nickel) in their commercial formulations (GIMENO-GARCÍA et al., 1996, DEFARGE et al., 2018). All of these chemicals applied to agricultural areas can be carried to aquatic environments and may end up trapped in the water and soil of reservoirs (PALANQUES et al., 2014). The mechanisms of input of pollutants into reservoirs include atmospheric deposition, rainwater that promotes surface runoff, washing of treated leaves, leaching and erosion of contaminated soils (TIRYAKI & TEMUR, 2010).

The organisms that live in these lentic environments may be in contact with these compounds through the body surface or through the ingestion of contaminated food or particles (VAN DER OOST et al., 2003). As a result of the continuous application of these chemicals, this long-term exposure to pollutants may decrease the organisms' ability to respond to naturally occurring environmental changes (e.g. temperature, conductivity, feed availability,

reproduction) (GANDAR et al., 2017).

Due to the high cost of monitoring multiple chemical pollutants, the use of environmental biomarkers in ecotoxicology studies is a feasible and easy to perform tool. These biomarkers allow to verify previous signs of biochemical changes in non-target organisms exposed, such as aquatic organisms (GHISI et al., 2014). Biomarkers' responses are useful for designing public policies that seek alternatives to minimize the effects of pollutants on a given population before a cascade effect disturbs the entire aquatic ecosystem. Biomarkers can be classified according to their response: effect (oxidative stress markers) and exposure (changes in the activity of enzymes involved with motor activity such as acetylcholinesterase and proteins regulating metals such as metallothioneins) (DALZOCHIO et al., 2016).

However, biochemical biomarkers are also influenced by seasonal factors, especially in ectothermic organisms, such as fish, whose physiology is totally related to the temperature of the environment (STOLIAR & LUSHCHAK, 2012). The rate at which chemicals are collected, metabolized, and disposed by fish may vary depending on the temperature. This causes variation in the toxicity of pollutants throughout the year, especially in subtropical regions such as southern Brazil where there is a large thermal amplitude (between 9 and 28 °C) (GARCIA et al., 2008, PATRA et al., 2015).

Thus, this study aimed to verify the temporal relationship between biochemical biomarkers of toxicity in two fish species and the environmental factors in a large reservoir in the southern region of Brazil.

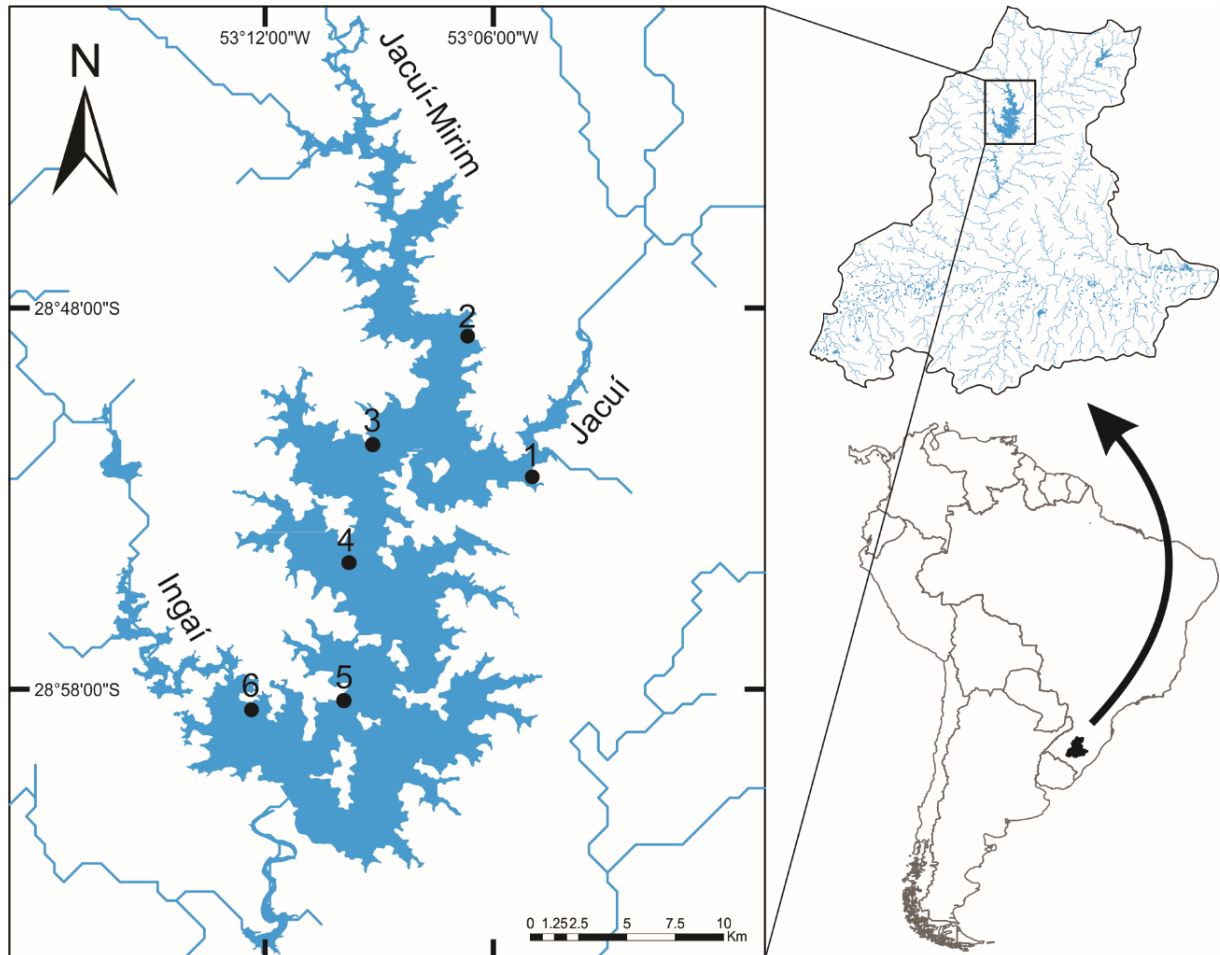
## 3.2 MATERIAL AND METHODS

### 3.2.1 Study Area

The Passo Real reservoir (Figure 3.1, highlighted), located in the central-north region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, is the largest of the cascading reservoirs in the Alto Jacuí basin, covering an area of 233.39 km<sup>2</sup>. It is inserted in the Southern Plateau (STRECK et al., 2008). The climate, according to the classification of Köppen, is subtropical humid (Cfa), with precipitations well distributed during all the months of the year. It was built in 1973 by dam of the Jacuí river for power generation, and now it is operating with a capacity of 158 MW. Thus, the water is retained for approximately 187 days (PEIXOTO et al., 2015). In relation to the use of the soil in its surroundings, a large part of the area is occupied by agricultural activities (soybean, corn, wheat, oats, canola and ryegrass) and livestock. It has few natural areas (Mixed Ombrophilous Forest (Araucaria Forest), Deciduous Forest and Savanna (Grasslands)). In addition to the disposal of waste from agricultural areas, the reservoir also receives large loads of sewage from adjacent households and also from medium-sized cities

located upstream (CEEE-GT, 2011; ZIANI et al., 2017).

Figura 3.1 – Passo Real reservoir, located in the Alto Jacuí basin, southern Brazil. Circles filled represent the six samples sites.



### 3.2.2 Organisms

*Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) (Siluriformes: Loricariidae) and *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Perciformes: Cichlidae) are species found throughout the year in the waters of the Jacuí river. Both seem to be well adapted to the temperature variations recorded in the water in the reservoir (16-28 °C) (CEEE-GT, 2011; AMARAL et al., 2018). They can be found in both lotic and lentic environments (REIS & PEREIRA, 2000; KULLANDER, 2003).

*L. anus* and *G. brasiliensis* were collected (n = 10, adults of both sexes) during a year, seasonally (February, May, August and November 2016) at six sites in the Passo Real reservoir (Figure 3.1). Waiting nets (mesh 5; 25 mm between nodes, 2 meters long) were set at sunset

at each site and collected in the following sunlight with a motor boat. Live animals removed from nets were placed in iceboxes. Euthanasia was performed by spinal cord section behind the operculum. After compute weight and length, brain, gills, liver and muscle were dissected and reserved in liquid nitrogen. The sample and transportation of biological material was authorized through the SisBio license 52097-2.

### 3.2.3 Abiotic Variables and Pollutant Analysis

Before the fish sampling, water parameters (temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity, oxidation/reduction potential and turbidity) were measured using a Horiba® multiparameter probe (model U-52) previously calibrated according to the altitude of the sampling site. Samples of water were collected for analysis of ammonia and nitrite (VERDOUW et al., 1978), pesticides (according to SABIN et al., 2009 - by the SPE method and analysis by LC-MS/ MS in the Analysis of Pesticide Residues Laboratory from the Federal University of Santa Maria (UFSM). Metals/trace elements (aluminum, cadmium, copper, lead, iron, mercury and manganese) were determined by inductively coupled plasma atomic emission (ICPE-9000 Shimadzu Scientific Instruments). First, the water samples were stabilized using distilled HNO<sub>3</sub> (0.5%) to quantification of total and dissolved metals. A multi-standard calibration method was applied: Perkin Elmer 10 mg/mL of twenty-nine metals (ICP-MS Standard, Matrix: 5% HNO<sub>3</sub>, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences), a standard of 10 mg/mL Hg (mercury standard 5% HNO<sub>3</sub> matrix, Perkin Elmer), and multi-standard Perkin Elmer 10 mg/mL rare-metal standard (Atomic Spectroscopy Standard, Matrix 5% HNO<sub>3</sub>). All metal measurements were made according to methods described in THOMAS (2004) and BAIG et al. (2010).

### 3.2.4 Biomarkers of Toxicity

Brain, gills, liver and muscle were homogenized (0.05 g/mL) in Tris-HCl buffer (50 mM pH 7.5), centrifuged at 1400 g/10 min (except for metallothionein assay, see below). The supernatant was used for all analyzes, which were determined on a 96-well microplate (except catalase).

Protein was determined in all tissues according to the methodology of BRADFORD (1976).

Acetylcholinesterase activity (AChE) was measured in brain and muscle as described by ELLMAN et al. (1961) with some modifications, using acetylthiocholine as substrate and a system (potassium phosphate buffer and 5,5'-dithio-bis- (2-nitrobenzoic) (DTNB)), expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

Catalase activity in the liver was determined according to the AEBI (1984) by the



principle of the decrease of the absorbance of hydrogen peroxide by catalase, expressed in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  of protein.

Activity of glutathione S-transferase (GST) was measured in all tissues according to HABIG et al. (1974) using 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate, which in the presence of reduced glutathione (GSH) form GS-dinitrobenzene (GS-DNB), expressed as  $\mu\text{mol}$  of GS-DNB/min/mg protein.

The level of non-protein thiols was determined in liver and gills according to ELLMAN (1959), through the reaction of DTNB with thiols groups after deproteinization with trichloroacetic acid (TCA), expressed as  $\mu\text{g}/\text{mg}$  tissue.

The lipid peroxidation was measured in all tissues by the quantification of malondialdehyde (MDA), using the TBARS methodology (TBA) according to DRAPER & HADLEY (1990), expressed as nmol of MDA/mg of protein.

The carbonylated protein content was analyzed in all tissues by the method described by YAN et al. (1995), using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form hydrazone, quantified spectrophotometrically and expressed as nmol of carbonylated protein/mg protein.

The concentration of metallothioneins was determined in the liver according to VIA-RENGO et al. (1997). The tissue was homogenized in Tris-HCl + phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) +  $\beta$ -mercaptoethanol buffer. The thiol groups present in the metallothioneins are quantified by the reaction of DTNB which forms yellow TNB, expressed as  $\mu\text{mol SH}/\text{g}$  tissue.

### 3.2.5 Statistics

Data matrix were constructed considering abiotic variables and pollutants (pesticides and metals) as predictors variables and biochemical as response. In the autumn, due to equipment failure, some abiotic water data at P1, P2 and P3 could not be recorded (see Supplementary Material, Table 3.1). These missing data were estimated using the Joint Modeling method, in which the missing data are imputed assuming that they can be described through a multivariate distribution (DRAY & JOSSE, 2015). The packages missMDA, FactoMineR, factoextra and IPCA algorithm were used, based on the other existing data, performed in the program R Studio. Due to the occasional record of some pesticides in water (e.g. tebuconazole, thiacloprid, trichlorfon) at certain sample sites (see Supplementary Material, Table 3.2), these were not considered in the analysis. Redundancy analysis (RDA) was performed to evaluate the biomarkers response to environmental parameters after data transformations. Vegan package was used for multivariate analyzes in the R environment.

### 3.3 RESULTS

*G. brasiliensis* ( $42 \pm 10$  cm/ $13 \pm 1$  g) was not registered at three sample sites in autumn (P3, P4 and P5) and at P1 both in winter and spring. *L. anus* ( $32 \pm 12$  cm/ $24 \pm 1$  g) was collected at all sample sites and seasons.

Among the pesticides analyzed in the water from the reservoir (see Supplementary Material, Table 3.3), were detected the herbicides atrazine and simazine, the fungicides azoxystrobin and tebuconazole and the insecticides imidacloprid, propoxur, trichlorfon and thiacloprid. The highest number of pesticides was recorded in the spring, followed by winter, autumn and summer (only atrazine).

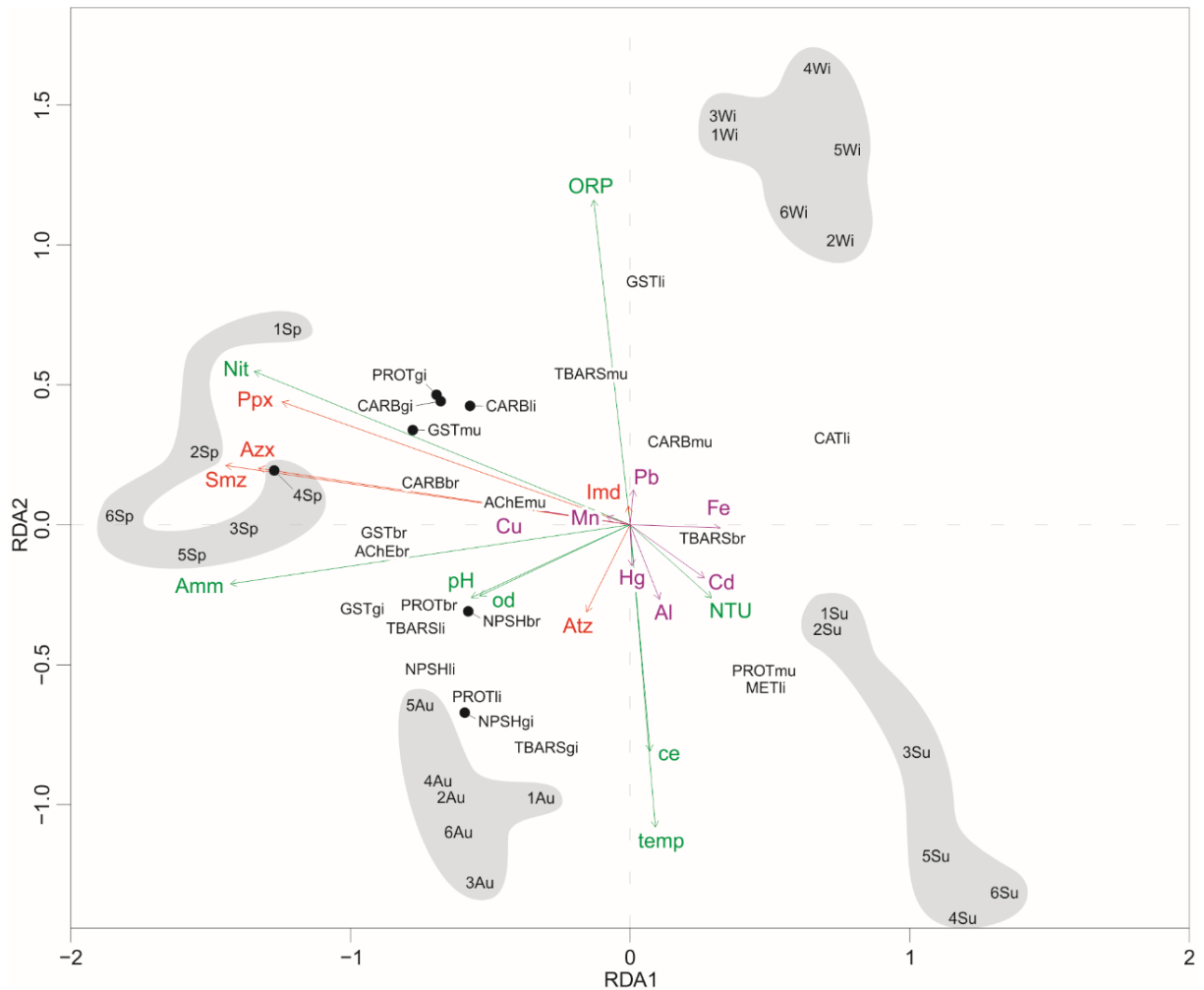
In relation to the heavy metals and trace elements found in the water of the reservoir (see Supplementary Material, Table 3.4), there was no statistical difference between the seasons (data not shown). Considering the sites, in general, the largest quantities of total aluminum were recorded at the most upstream sites (P1 and P2). Cadmium appears to be uniformly distributed in the water of the reservoir. Higher values of copper were recorded at the most downstream site (P6). In P2 there was lower iron in relation to the other sites. High amounts of mercury were recorded in P3. In both P3 and P5, the manganese values were higher than the other sites. Higher amounts of lead were found in P4 and P6.

Considering the integrated response of biochemical data and abiotic data (water parameters, pesticides and metals), the redundancy analysis (RDA) was significant and explained 96% of the total variance for *L. anus* and 99% for *G. brasiliensis*. For both species, especially for *L. anus*, there was a visible separation of the sites in relation to the seasons (Fig. 3.2 and Fig. 3.3).

For *L. anus*, RDA identified a significant first canonical axis that explained 32% of the variability of the relationship between biochemical and abiotic data and was responsible for a clear separation of winter-summer from spring-autumn (Figure 3.2). The abiotic variables that contributed positively to the variation were iron, turbidity and cadmium and negatively simazine, ammonia, nitrite, azoxystrobin, propoxur, pH, dissolved oxygen and copper. The second axis explained 19% of the total variability of the data and was responsible for the less clear separation of winter-spring from summer-autumn. The variables that contributed positively to this separation were oxidation/reduction potential, nitrite and propoxur. The variables that contributed negatively were temperature, electrical conductivity, atrazine, pH and aluminum.

The biochemical analyzes that more were influenced by summer were the proteins of the muscle and metallothioneins of the liver. For the autumn TBARS, GST and non-protein thiols of gills, proteins, TBARS and non-protein thiols of the liver, proteins and non-protein thiols of the brain. In the winter, TBARS and carbonyl from muscle as well as catalase and GST of liver. For spring AChE, GST and carbonyl of brain, AChE and GST of muscle.

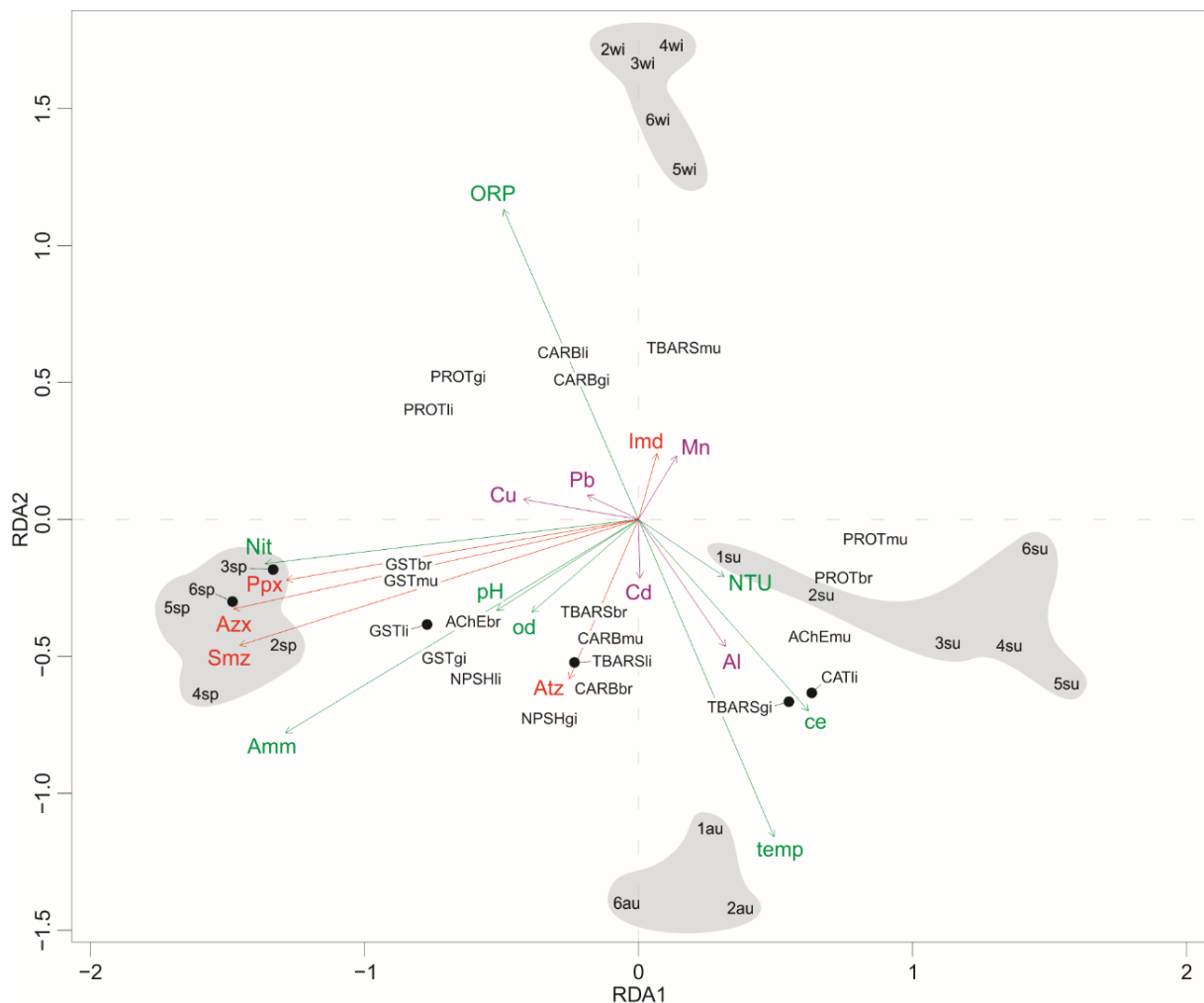
Figura 3.2 – Redundancy analysis of *Loricariichthys anus* showing sampling sites (1 to 6) in each season (summer, autumn, winter, spring), environmental variables (green arrows), pesticides (red arrows), metals (purple arrows) and toxicity biomarkers (black letters). Gray shading highlighting the separation of sampling sites by season. Abbreviations: li - liver; gi - gills; br - brain; mu - muscle; PROT - protein; MET - metallothioneins; CARB - carbonylated proteins; temp - temperature; do - dissolved oxygen; ec - electrical conductivity; ORP - oxidation/reduction potential; NTU - turbidity; Nit - nitrite; Amm - ammonia; Atz - atrazine; Imd - imidacloprid; Azx - azoxystrobin; Ppx - propoxur; Smz - simazine.



The first canonical axis of the RDA of *G. brasiliensis* explained 36% of the biochemical and abiotic data variability and was responsible for the separation of spring from autumn-winter-summer (Figure 3.3). The abiotic variables that contributed positively to the variation were: electrical conductivity, temperature, turbidity and aluminum and negatively azoxystrobin, simazine, nitrite, ammonia, propoxur, pH, oxidation/reduction potential, copper, dissolved oxygen and atrazine. The second axis of the RDA explained 25% of the variability and separated summer-autumn-spring from winter. The variables that contributed positively were: oxidation/reduction potential, imidacloprid, manganese and negatively temperature, ammonia, electrical conductivity, atrazine, simazine, aluminum, dissolved oxygen, pH and azoxystrobin. The bi-

ochemical parameters most closely related to the summer were protein and AChE of muscle, brain protein, liver catalase, TBARS and non-protein thiols of gills. For autumn TBARS and carbonyl of brain, carbonyl of muscle and TBARS of liver. In the winter, TBARS of muscle, carbonyl and proteins of liver and carbonyl and proteins of gills. In the spring non-protein thiols and GST of liver, GST from gills, GST and AChE of brain, GST of muscle.

Figura 3.3 – Redundancy analysis of *Geophagus brasiliensis* showing sampling sites (1 to 6) in each season (summer, autumn, winter, spring), environmental variables (green arrows), pesticides (red arrows), metals (purple arrows) and toxicity biomarkers (black letters). Gray shading highlighting the separation of sampling sites by season. Abbreviations: li - liver; gi - gills; br - brain; mu - muscle; PROT - protein; MET - metallothioneins; CARB - carbonylated proteins; temp - temperature; do - dissolved oxygen; ec - electrical conductivity; ORP - oxidation/reduction potential; NTU - turbidity; Nit - nitrite; Amm - ammonia; Atz - atrazine; Imd - imidacloprid; Azx - azoxystrobin; Ppx - propoxur; Smz - simazine.



### 3.4 DISCUSSION

The redundancy analysis (RDA) is a method to extract and summarize the variation in a set of response variables that can be explained by a set of explanatory variables (LEGENDRE & ANDERSON, 1999). The ordering diagram obtained by the RDA analysis for both species clearly separated seasons that were especially related to environmental variables such as ammonia, nitrite, temperature, electrical conductivity and oxidation/reduction potential as well as the presence of pesticides such as simazine, azoxystrobin and propoxur, in particular for the *L. anus*. For *G. brasiliensis*, the separation of the seasons was less clear perhaps by the absence of animals at some sampling sites, especially in the autumn.

The RDA analysis also indicated the influence of the abiotic variables on the biochemical variables. In *L. anus*, the tissues most affected by exposure to simazine, propoxur and azoxystrobin were brain and muscle during spring. Other abiotic variables such as nitrite and ammonia were also related to this season. In addition, the presence of other pesticides (tebuconazole, thiacloprid and trichlorfon) in the spring may also have contributed to this result, although these were not considered for the construction of the RDA. The spring months coincide with the greater diversity of crops (e.g. corn, sorghum, soybean, sunflower, beans and vegetables) in the areas surrounding the reservoir, which implies the greater diversity of pesticides detected. In autumn it became clear that there was more oxidative damage to tissues, especially in the brain. Of the variables analyzed in this study for this season, the reason for this damage is unclear. Perhaps the decline in temperature is a likely explanation. During acclimatization at colder temperatures, the body needs to adjust to keep energy production at an optimal level. The temperature adaptation involves adjustments both in the density and in the functional properties of the mitochondria, thus affecting the generation of reactive species (PÖRTNER, 2002; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). In order to maintain fluidity at low temperatures, there is a need for the accumulation of unsaturated and polyunsaturated fatty acids, which are primary targets for the attack of free radicals (RADY et al., 1990; ABELE & PUNTARULO, 2004; BAGNYUKOVA et al., 2007). In addition, temperature affects the catalytic efficiency and the binding capacity of enzymes (HOCHACHKA & SOMERO, 1984), which may have affected the activity of the antioxidant enzymes and led to oxidative damage in that tissue. Brain is a tissue susceptible to oxidative damage because of its high metabolic rate, presence of highly unsaturated fatty acids and auto-oxidizing neurotransmitters such as dopamine and norepinephrine (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; CAZENAVE et al., 2014).

In the spring, which had a great contribution of abiotic variables such as ammonia and nitrite as well as simazine, azoxystrobin and propoxur, there was a strong relationship of these with the GST of all the tissues of *G. brasiliensis* and *L. anus* (except liver). Ammonia is known to alter the energetic metabolism resulting in decreased concentrations of ATP in the body, modify the ionic balance and may impair the structure of the gills (CARVALHO et al., 2012, CAZENAVE et al. 2014). Besides GST is an enzyme strongly related to detoxification, it

is also responsible for the transport of sex hormones (ZHOU et al., 2009). *G. brasiliensis* reproduces during the hot months, therefore, this relationship of GST of the liver to spring could be explained as a preparation for mating and spawning. In *G. brasiliensis* the relationship between GST and lipid peroxidation in the liver was also clear, which can be explained by the great variety of pesticides registered in the water. It is known that GST is involved in the conjugation between GSH and lipid peroxides resulted from oxidative damage to lipids (MONSERRAT et al., 2012; CLASEN et al., 2018).

Pesticides found in water of the reservoir are known to cause changes in many biochemical biomarkers in fish at laboratory exposures (GONÇALVES et al., 2018; MARINS et al., 2018; GUERRA et al., 2019). By altering the normal activity of the AChE enzyme, fish may present erratic swimming and behavioral disturbances, which may impact the fitness of the population by interfering with the ability to avoid predators or to find food and reproductive partners (HAMILTON et al., 2016). The AChE of brain of both species also had strong relation with the variables of the spring like the pesticides and ammonia and nitrite.

There was less contribution of metals found in water to the multivariate analysis. Although there was no seasonal difference of metals in the water, it is known that many pesticides, besides fertilizers, have trace metals in their formulations (DEFARGE et al., 2018). The more extensive input of metals from agricultural areas and also untreated sewage could increase oxidative damage. Metals have high affinity with thiol groups, affecting many cellular processes, increasing the level of reactive species (LUSHCHAK, 2016). In addition, metals are known to accumulate in the body and, especially those without known biological function, such as aluminum, cadmium, mercury and lead could cause direct damage to organs (SAKURAGUI et al., 2013). Aluminum caused neurotoxicity and oxidative damage in a fish species exposed to a concentration of  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  after 96 hours (FERNÁNDEZ-DÁVILA et al., 2012).

Different responses of *L. anus* and *G. brasiliensis* exposed to the same environmental conditions may occur due to the different trophic positions of these species. *L. anus* is benthic and omnivorous and *G. brasiliensis* is pelagic and omnivorous-herbivorous (GARCIA et al., 2006). Different diets present different compositions of mono and polyunsaturated fatty acids that vary in susceptibility to lipid peroxidation (PRYOR et al., 1976; AVERY et al., 1998; OAKES et al., 2004). In a reservoir, benthic *Pimelodus maculatus*, which is in direct contact with the sediment, presented higher levels of lipid peroxidation in the liver than *Astyanax fasciatus* which is pelagic (SAKURAGUI et al., 2013). It is also known that fish with different ecological needs have different sensitivities to exposure to pollutants (ATLI et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2016).

The compiled parameters evaluated in this study including biochemical biomarkers such as oxidative stress and damage, neurotoxicity of biological material and abiotic factors measured in water (physical-chemical, pesticides and metals) provided a discrimination of the seasons in function of specific seasonal environmental conditions. It was possible to see that the environmental factors also caused fluctuations in the biochemical responses and this may be normal

to the organism. In short-term field work it is difficult to establish the degree of effect of exposure to multiple pollutants to aquatic organisms from a normal response. Thus, a long-term biomonitoring would be necessary considering the same physical-chemical parameters of water and sediment and analysis of contaminants. As temperature seems to be one of the most important abiotic variable for fish, in future studies biochemical biomarkers responses should be evaluated in animals exposed only to variable temperatures, keeping the other environmental factors controlled. In this way, it would be possible to discriminate the normal variation in relation to the temperature from the effect of exposure to pollutants.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Dr. Cristian de Sales Dambros for assistance with statistics, MSc. Renan Rodrigo Duarte for assisting in the biological sampling and elaboration of the images, Adelar Feder for acting in the sampling of the animals, Jonatan Neske Blank for the aid in the questions of agricultural crops. The present work was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

#### REFERENCES

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405-415, 2004.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AMARAL, A. M. B.; GOMES, J. L. C.; WEIMER, G. H.; MARINS, A.T.; LORO, V. L.; ZANELLA, R. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, v. 191, p. 876-885, 2018.
- ATLI, G.; CANLI, E. G.; EROGLU, A.; CANLI, M. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 30-37, 2016.
- AVERY, E. L.; DUNSTAN, R. H.; NELL, J. A. The use of lipid metabolic profiling to assess biological impact of marine sewage pollution. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 229-235, 1998.

BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, p. 227-234, 2007.

BARRETO, S.; HERMAN, L.; GARIBOTTI, V. Levantamento dos agroquímicos usados no Estado do Rio Grande do Sul por Bacia Hidrográfica. **Boletim Epidemiológico**, v. 14, n. 2, p. 3-6, 2012.

BAIG, J. A.; GUL KAZI, T.; QADIR SHAH, A.; ABBAS KANDHRO, G.; IMRAN AFRIDI, H.; BALAL ARAIN, M.; KHAN JAMALI, M.; JALBANI, N. Speciation and evaluation of Arsenic in surface water and groundwater samples: A multivariate case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 914-923, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, I. A.; FREIRE, C. A.; YAMAMOTO, F. Y.; ASSIS, H. C. S.; SOUZA-BASTOS, L. R.; CESTARI, M. M.; GHISI, N. C.; PRODOCIMO, V.; FILIPAK NETO, F.; RIBEIRO, C. A. O. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarkers evaluation in tropical fish. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, p. 615-625, 2012.

CARVALHO, C. S.; BERNUSSO, V. A.; ARAÚJO, H. S. S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FERNANDES, M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, p. 60-69, 2012.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; ROSSI, A.; ALE, A.; CAMPANA, M.; PARMA, M. J. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. **Ecological Indicators**, v. 38, p. 104-112, 2014.

CEEE-GT, Companhia Estadual de Geração e Transmissão de Energia Elétrica. **Plano de uso e ocupação do solo no entorno do reservatório da UHE Passo Real**. Porto Alegre: Profill, 2011.

CLASEN, B.; LORO, V. L.; MURUSSI, C. R.; TIECHER, T. L.; MORAES, B.; ZANELLA, R. Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 737-743, 2018.

DALZUCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; PETRY, I. E.; GEHLEN, G.; SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, p. 283-298, 2016.

DEFARGE, N.; VENDÔMOIS, J. S.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 156-163, 2018.



DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DRAY, S.; JOSSE, J. Principal component analysis with missing values: a comparative survey of methods. **Plant Ecology**, v. 216, p. 657-667, 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERNÁNDEZ-DÁVILA, M. L.; RAZO-ESTRADA, A. C.; GARCÍA-MEDINA, S.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; PIÑÓN-LÓPEZ, M. J.; IBARRA, R. G.; GALAR-MARTÍNEZ, M. Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae - *Ctenopharingodon idella*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 87-92, 2012.

GANDAR, A.; LAFFAILLE, P.; MARTY-GASSET, N.; VIALA, D.; MOLETTE, C.; JEAN, S. Proteome response of fish under multiple stress exposure: effects of pesticides mixtures and temperature increase. **Aquatic Toxicology**, v. 184, p. 61-77, 2017.

GARCIA, A. M.; HOEINGHAUS, D. J.; VIEIRA, J. P.; WINEMILLER, K. O.; MARQUES, D. M. L. M.; BEMVENUTI, M. A. Preliminary examination of food web structure of Nicola Lake (Taim Hydrological System, south Brazil) using dual C and N stable isotope analyses. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 279-284, 2006.

GARCIA, L. O.; COPATTI, C. E.; WACHHOLZ, F.; FILHO, W. P.; BALDISSEROTTO, B. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 2, 2008.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; FÁVARO, L. F.; ASSIS, H. C. S.; PRIOLI, A. J. In situ assessment of a Neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, p. 699-709, 2014.

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19-25, 1996.

GONÇALVES, C. R.; MARINS, A. T.; AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J.; SEVERO, E. S.; MORAES, B. S.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 100, n. 4, 524-528, 2018.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic

step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. Oxford: Oxford University Press, 2007. 968 p.

HAMILTON, P. B.; COWX, I. G.; OLEKSIK, M. F.; GRIFFITHS, A. M.; GRAHN, M.; STEVENS, J. R.; CARVALHO, G. R.; NICOL, E.; TYLER, C. R. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals – a critical review. **Fish and Fisheries**, v. 3, n. 3, p. 545-566, 2016.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation**. Princeton: Princeton University, 1984. 537 p.

KULLANDER, S. O. Cichlidae (Cichlids). In: **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. (Eds), Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2003. p. 605-654.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. **Ecological Monographs**, v. 69, n. 1, p. 1-24, 1999.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 711-747, 2016.

MARINS, A. T.; RODRIGUES, C. C. R.; MENEZES, C. C.; GOMES, J. L. C.; COSTA, M. D.; NUNES, M. E. M.; VIEIRA, M. S.; DONATO, F. F.; ZANELLA, R.; SILVA, L. P.; LORO, V. L. Integrated biomarkers response confirm the antioxidant role of diphenyl diselenide against atrazine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p. 191-198, 2018.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p. 75-88, 2005.

MONSERRAT, J. M.; LETTS, R. E.; FERREIRA, J. L. R.; VENTURA-LIMA, J.; AMADO, L. L.; ROCHA, A. M.; GORBI, S.; BOCCHETTI, R.; BENEDETTI, M.; REGOLI, F. Biomarkers of oxidative stress: benefits and drawbacks for their application in biomonitoring of aquatic environments. In: **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. ABELE, D.; VÁZQUEZ-MEDINA, J. P.; ZENTENO-SAVÍN, T. (Eds), Nova Jersey: Blackwell Publishing, 2012. p. 317-326.

OAKES, K. D.; MCMASTER, M. E.; VAN DER KRAAK, G. J. Oxidative stress response in longnose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 67, p. 255-271, 2004.

PALANQUES, A.; GRIMALT, J.; BELZUNCES, M.; ESTRADA, F.; PUIG, P.; GUILLÉN, J. Massive accumulation of highly polluted sedimentary deposits by river damming. **Science of**

the **Total Environment**, v. 497-498, p. 369-381, 2014.

PATRA, R. W.; CHAPMAN, J. C.; LIM, R. P.; GEHRKE, P. C.; SUNDERAM, R. M. Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 8, 1809-1817, 2015.

PEIXOTO, D. W. B.; FILHO, W. P.; SANTOS, F. C. Transparência da água do reservatório Passo Real e fator de reflectância em imagens do sensor moderate resolution imaging spectroradiometer – modis. **Revista Geo**, n. 26, p. 288-300, 2015.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 739-761, 2002.

PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**, v. 11, p. 370-379, 1976.

RADY, A. A. R.; CSENGERI, I.; MATKOVICS, B. Phospholipid fatty acid composition and lipid peroxidation in some tissues of carp acclimated to different environmental temperatures. **Aquaculture Hungary**, v. 6, p. 161-170, 1990.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L. Three new species of the Loricariid catfish genus *Loricariichthys* (Teleostei: Siluriformes) from Southern South America. **Copeia**, v. 4, p. 1029-1047, 2000.

SABIN, G. P.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 918-925, 2009.

SAKURAGUI, M. M.; PAULINO, M. G.; PEREIRA, C. D. S.; CARVALHO, C. S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; FERNANDES, M. N. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 41-51, 2013.

SINHA, A. K.; LIEW, H. J.; DIRICX, M.; BLUST, R.; DE BOECK, G. The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in gold fish (*Carassius auratus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 33-46, 2012.

STOLIAR, O. B.; LUSHCHAK, V. I. Environmental pollution and oxidative stress in fish. In: **Oxidative Stress: Environmental Induction and Dietary Antioxidants**. LUSHCHAK, V. I. (Ed.). Rijeka: InTech, Croatia, 2012. p. 131-166.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 222 p.

THOMAS, R. **Practical Guide to ICP-MS**. New York: Marcel Dekker, 2004.

TIRYAKI, O.; TEMUR, C. The fate of pesticide in the environment. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, v. 4, n. 10, p. 29-38, 2010.

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

VERDOUW, H.; VANECHTELD, C. J. A.; DECKKERS, E. M. J. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, p. 399-402, 1978.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, p. 69-84, 1997.

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; SANTOS, G. S.; STREMEL, T. R. O.; DORIA, H. B.; GUSSO-CHOUERI, P.; CAMPOS, S. X.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; CESTARI, M. M.; FILIPAK NETO, F.; AZEVEDO, J. C. R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçú River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18111-28, 2016.

YAN, L. J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 228, p. 349-351, 1995.

ZHOU, J.; WANG, W. N.; WANG, A. L.; HE, W. Y.; ZHOU, Q. T.; LIU, Y.; XU, J. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and regulation under pH stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, p. 224-230, 2009.

ZIANI, P.; FOLETO, E. M.; WOLLMANN, C. A. Analysis and geographic characterization of Hydrographic Basin of Alto Jacuí/RS. **Ciência e Natura**, v. 39, p. 58-74, 2017.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Tabela 3.1 – Abiotic data collected over a year at six sites in the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil (DO: dissolved oxygen - mg/L, EC: electrical conductivity - mS/cm; ORP: oxidation/reduction potential - mV; NTU: turbidity; Amm: Ammonia -  $\mu\text{mol}$  ammonia/mL; Nit: nitrite - mg/mL) (\* refers to equipment failure).

		T °C	pH	DO	EC	ORP	NTU	Nit	Amm
Summer	P1	27.7	6.9	12.1	0.053	299	49.8	0.0138	0.0139
	P2	27.6	6.3	10.4	0.049	337	46.1	0.0037	0.0017
	P3	27	7.2	12.3	0.052	291	24.2	0.0049	0.0011
	P4	30.2	8.8	12.6	0.053	236	25.3	0.0058	0.0033
	P5	28.6	7.6	10.9	0.049	279	9.5	0.0055	0.0039
	P6	32.2	8.1	9.4	0.047	250	91.7	0.0031	0.0039
Autumn	P1	*	5.7	*	*	*	*	0.0119	0.0238
	P2	*	6.1	*	*	*	*	0.0126	0.015
	P3	*	6.1	*	*	*	*	0.0122	0.0012
	P4	18.8	7.1	14.5	0.052	341	45.6	0.019	0.0075
	P5	19.1	7.9	14.3	0.051	294	39.6	0.0145	0.0138
	P6	19.2	8.5	18.5	0.048	240	38.6	0.018	0.0075
Winter	P1	17	6.9	12.3	0.052	300	73	0.0036	0.0145
	P2	16.1	6.9	11.4	0.045	306	52.4	0.0017	0.0213
	P3	15.8	6.7	11.6	0.048	330	29.2	0.0031	0.0175
	P4	15.9	6.5	14.7	0.048	332	27.1	0.0042	0.0145
	P5	16.4	6.4	14.3	0.047	319	21.2	0.0072	0.0039
	P6	15.6	6	13.4	0.044	339	16.5	0.0062	0.0037
Spring	P1	27.2	7.9	11.9	0.052	310	33.2	0.0348	0.0124
	P2	27.2	8.2	9.5	0.047	300	34.1	0.0429	0.0237
	P3	24.9	8.8	11.9	0.049	269	48.6	0.0405	0.035
	P4	22	8	12.4	0.047	323	36.4	0.0266	0.026
	P5	24	8.5	20.1	0.05	279	22.2	0.0209	0.0158
	P6	23	7.3	11.2	0.029	320	12.1	0.0243	0.0181

Tabela 3.2 – List of agrochemicals found in the water at six sites over a year (2016) in the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil (concentration in µg/L). (Determination of pesticide residues using SPE and LC-MS/MS analysis; LOQ: quantification limit) (\* <LOQ).

		Atrazine Herbicide Triazine	Imidacloprid Insecticide Neonicotinoid	Simazine Herbicide Triazine	Azoxystrobin Fungicide Strobilurin	Propoxur Insecticide Carbamate	Tebuconazol Fungicide Triazol	Tiacloprid Insecticide Neonicotinoid	Trichlorfon Insecticide Organophosphate
Summer	P1	0.51							
	P2	0.56							
	P3	0.41							
	P4	0.23							
	P5	0.25							
	P6	0.21							
Autumn	P1								
	P2	*	0.04	*					
	P3	*	0.05	*					
	P4	0.03	0.02	*					
	P5	0.04	*	0.024					
	P6	0.05	0.04	0.03					
Winter	P1	0.03	0.02			0.02			
	P2	0.02	0.03			*			
	P3	0.03	0.02	*	*	*			
	P4	0.02	0.04		*	*			
	P5	0.03	*	*	*	*			
	P6	0.03		*	*	*			
Spring	P1	0.19		0.07		0.03			
	P2	0.54	*	0.16	0.03	0.03	0.04		0.07
	P3	0.38	*	0.12	0.02	0.04		0.03	
	P4	0.4	*	0.16	0.02	*	0.05		0.09
	P5	0.17		0.09	0.03	0.04			
	P6	0.3		0.11	0.03	0.03			

Tabela 3.3 – List of pesticides investigated in the water of the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil ( $\mu\text{g/L}$ ) using SPE and LC-MS/MS analysis. Differences in LOD and LOQ values between seasons occurred due to standardization methods. Traces represent pesticides that have not been investigated in certain seasons.

(Continua)

	Summer		Autumn		Winter		Spring	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
3-Hydroxycarbofuran	0.04	0.13	-	-	-	-	-	-
Atrazine	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Azinphos-ethyl	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Azinphos-methyl	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Azoxystrobine	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Bentazon	-	-	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Bitertanol	-	-	0.024	0.08	0.024	0.08	0.024	0.08
Boscalid	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Bromuconazole	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Carbaryl	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Carbofuran	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Carboxin	0.04	0.13	-	-	-	-	-	-
Chlorimuron	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Chlorpyrifos-ethyl	-	-	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Chlorpyrifos-metyl	-	-	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Cyanazine	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Deltamethrin	0.15	0.50	-	-	-	-	-	-
Diazinon	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Dichlofluanid	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	-	-
Difenoconazole	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Dimethoate	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Epoxiconazole	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Fenarimol	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Fenthion	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Fipronil	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Fluquinconazol	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Flotulanil	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Imidacloprid	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.024	0.08
Iprovalicarb	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Linuron	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Malathion	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Mecarbam	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Mepronil	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Metalaxyl	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Metconazole	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Methiocarb sulfone	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Methiocarb sulfoxide	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02

Tabela 3.3 – List of pesticides investigated in the water of the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil ( $\mu\text{g/L}$ ) using SPE and LC-MS/MS analysis. Differences in LOD and LOQ values between seasons occurred due to standardization methods. Traces represent pesticides that have not been investigated in certain seasons.

(Continuação)

Mevinphos	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Monocrotophos	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	-	-
Monolinuron	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Myclobutanil	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Oxamyl	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Paraoxon-ethyl	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Pendimethalin	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Profenophos	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Propiconazole	0.08	0.25	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Propoxur	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Propyzamide	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Pyraclostrobin	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Pyrazophos	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Pyridaphention	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Simazine	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Tebuconazole	0.04	0.13	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Terbufos	-	-	0.024	0.08	0.024	0.08	0.024	0.08
Terbutylazine	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Tetraconazole	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Thiacloprid	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Thiamethoxam	0.04	0.13	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Thiodicarb	0.08	0.25	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Tolclofos-methyl	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Triadimefon	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Triadimenol	-	-	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Triazophos	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Trichlorfon	-	-	0.006	0.02	0.006	0.02	0.006	0.02
Trifloxystrobin	-	-	0.012	0.04	0.012	0.04	0.012	0.04
Vamidothion	0.04	0.13	0.006	0.02	0.006	0.02	-	-



Tabela 3.4 – Heavy metals and trace elements (mg/L) (total/filtered) found in water at the six sites over a year (2016) in the Passo Real reservoir, Alto Jacuí basin, southern Brazil. (\* lost data).

		Al	Cd	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb
Summer	P1	2.55/2.25	0.98/0.77	0.35/0.30	1.07/0.88	0.0089/0.0077	0.87/0.67	0.077/0.045
	P2	2.38/2.25	0.88/0.07	0.48/0.35	0.98/0.82	0.0077/0.0054	0.95/0.85	0.045/0.035
	P3	1.89/1.55	0.68/0.55	0.57/0.44	1.25/1.07	0.0890/0.0670	1.17/0.98	0.045/0.038
	P4	2.15/1.98	0.70/0.56	0.50/0.40	1.07/0.88	0.0077/0.0055	0.85/0.75	0.088/0.077
	P5	1.60/1.45	0.62/0.58	0.56/0.48	1.15/1.03	0.0880/0.0720	1.17/1.07	0.058/0.050
	P6	1.89/1.77	0.88/0.67	0.65/0.60	1.07/0.98	0.0089/0.0078	0.95/0.78	1.200/0.950
Autumn	P1	2.85/2.45	0.78/0.58	0.38/0.28	1.15/0.98	0.0077/0.0067	0.77/0.65	0.089/0.055
	P2	2.45/2.35	0.77/0.65	0.55/0.38	0.93/0.82	0.0089/0.0080	0.87/0.78	0.088/0.065
	P3	1.77/1.56	0.65/0.57	0.58/0.44	1.17/1.08	0.0990/0.0650	1.12/1.07	0.057/0.048
	P4	2.10/1.98	0.68/0.55	0.48/0.40	1.17/0.98	0.0088/0.0055	0.87/0.82	0.092/0.080
	P5	1.58/1.40	0.67/0.55	0.60/0.55	1.17/0.98	0.0092/0.0070	1.15/1.01	0.077/0.065
	P6	1.77/1.55	0.87/0.72	0.72/0.65	1.08/0.95	0.0095/0.0082	0.98/0.82	1.150/0.950
Winter	P1	1.88/1.55	0.65/0.45	0.47/0.37	1.27/1.10	0.0089/0.0077	0.92/0.81	0.077/0.058
	P2	2.38/2.25	0.82/0.78	0.58/0.48	0.90/0.80	0.0077/0.0070	0.88/0.75	0.095/0.088
	P3	1.78/1.58	0.60/0.54	0.49/0.42	1.15/0.98	0.0890/0.0650	1.10/1.03	0.059/0.045
	P4	1.85/1.65	0.75/0.55	0.55/0.40	1.07/0.89	0.0078/0.0055	0.95/0.77	1.050/0.950
	P5	1.55/1.45	0.68/0.55	0.58/0.48	1.07/0.95	0.0087/0.0065	1.05/0.95	0.089/0.072
	P6	1.67/1.55	0.85/0.77	0.70/0.58	1.18/1.03	0.0098/0.0082	0.90/0.77	1.070/0.980
Spring	P1	2.37/2.15	0.59/0.47	0.58/0.45	1.17/0.89	0.0780/0.0650	1.15/0.95	0.087/0.067
	P2	2.55/2.45	0.75/0.68	0.55/0.45	0.85/0.75	0.0080/0.0065	0.92/0.77	0.085/0.079
	P3	1.65/1.40	0.55/0.50	0.52/0.44	1.10/0.93	0.0880/0.0670	1.10/1.07	0.055/0.045
	P4	1.93/1.87	0.88/0.67	0.65/0.58	1.15/1.07	0.0088/0.0077	0.90/0.75	1.150/0.980
	P5	1.45/1.35	0.65/0.55	0.55/0.43	*	0.0098/0.0065	1.05/0.92	0.087/0.075
	P6	1.55/1.40	0.90/0.77	0.77/0.65	1.07/0.98	0.0088/0.0065	0.92/0.70	1.050/0.880

## 4 DISCUSSÃO GERAL

*Este capítulo apresenta a discussão geral da tese considerando os resultados dos Capítulos 2 e 3.*

### 4.1 ARGUMENTAÇÃO

Em consequência de diversas atividades antrópicas, os ecossistemas estão sob pressão a um complexo de misturas de contaminantes (STOLIAR & LUSHCHAK, 2012). Ambientes aquáticos, especialmente os de água doce, são considerados sumidouros para muitos contaminantes ambientais terrestres. Estes poluentes presentes na água podem, então, interagir com os organismos que ali vivem. Grandes reservatórios, como o Passo Real, que são utilizados para geração de energia elétrica, acumulam e retêm contaminantes, uma vez que as águas ficam represadas artificialmente, possibilitando a deposição de substâncias.

Estudos de ecotoxicidade em campo são ecologicamente importantes pois permitem avaliar *in situ* as respostas de organismos a poluentes considerando variáveis abióticas e biológicas e suas interações, apresentando respostas integrativas especialmente a misturas complexas de poluentes (GHISI et al., 2014).

Peixes são organismos muito utilizados em avaliações ecotoxicológicas de campo no Brasil (WILHELM-FILHO et al., 2001; DA ROCHA et al., 2009; BRITO et al., 2012; SAKURAGUI et al., 2013; LORO et al., 2015; WUNDERLICH et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2016; GHISI et al., 2017; NIMET et al., 2017; VIEIRA et al., 2017) e em outros países (QUINN et al., 2010; JOLLY et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; RAUTENBERG et al., 2015; LOUIZ et al., 2016). Eles ocupam posições chave nas cadeias tróficas aquáticas, conectando níveis mais basais a níveis mais elevados. Além disso, geralmente apresentam vida longa e podem ser amostrados durante o ano todo, permitindo avaliação de mudanças sazonais (JARAMILLO-VILLA & CARAMASCHI, 2008).

Biomarcadores são análises bioquímicas, moleculares, comportamentais que avaliam desvios do estado normal do organismo em função de exposição a xenobióticos (VAN DER OOST et al., 2003) e complementam avaliações físico-químicas da água e do sedimento do ambiente de estudo. O reservatório Passo Real, localizado na Bacia do Alto Jacuí, recebe diversos químicos oriundos das áreas agrícolas do seu entorno. Ausência de mata ripária, que age como uma barreira ao escoamento superficial e lixiviação de contaminantes das monoculturas adjacentes (VIEIRA et al., 2016), aumenta a probabilidade de carreamento de poluentes terrestres. Estes poluentes podem causar uma situação de estresse nos organismos aquáticos que desencadeia uma cascata de respostas biológicas.

Neste estudo, onde foram avaliados diversos biomarcadores bioquímicos em duas espé-

cies peixes com nichos diferentes coletadas nas quatro estações do ano, foi possível perceber que variáveis abióticas que variam sazonalmente são extremamente importantes na regulação destes biomarcadores (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). Desta forma, é difícil separar uma resposta sazonal normal do organismo de uma resposta negativa exercida por um ou uma mistura de poluentes. Além disso, pode-se verificar que, em função do tipo de cultura agrícola, os contaminantes, no caso, pesticidas, também flutuaram sazonalmente. Na primavera, quando houve maior registro de pesticidas na água, é época onde há maior diversidade de cultivos na região do entorno do reservatório.

No Brasil estão autorizados para uso agrícola aproximadamente 381 ingredientes químicos (MAPA, 2016; ALBUQUERQUE et al., 2016). Neste estudo, foram detectados herbicidas (atrazina e simazina), inseticidas (imidacloprido, propoxur, tiacloprido e triclorfom) e fungicidas (azoxistrobina e tebuconazol) na água do reservatório Passo Real. Apesar de não terem sido incluídos nas análises de variância do Capítulo 3, também foram detectados pesticidas no sedimento, porém, apenas no outono e abaixo do limite de quantificação (tiametoxam, inseticida no ponto 2; pirazofós, fungicida no ponto 4; imidacloprido, inseticida no ponto 5).

As características químicas dos pesticidas definirão os efeitos tóxicos aos organismos expostos. Químicos hidrofílicos rapidamente tornam-se disponíveis à captação pelo epitélio branquial (TIERNEY et al., 2013; ITURBURU et al., 2016). Já aqueles hidrofóbicos podem acumular-se nos tecidos através de diferentes mecanismos: via captação direta da água pelas brânquias ou pele (bioconcentração), via captação de partículas suspensas (ingestão) ou via consumo de alimentos contaminados (biomagnificação) (VAN DER OOST et al., 2003).

Metais como alumínio, cádmio, cobre, chumbo, ferro, manganês e mercúrio foram quantificados na água do reservatório. A presença de metais em ambientes aquáticos muitas vezes deve-se ao tipo de solo da região. O solo do Passo Real é do tipo latossolo vermelho que apresenta elevadas quantidades de alumínio e ferro (VASCONCELOS et al., 2008). Outras fontes de metais aos ecossistemas aquáticos provem do aporte de dejetos industriais e domiciliares ou mesmo de alguns tipos de pesticidas (i.e. formulações comerciais) (DEFARGE et al., 2018) e como impurezas em fertilizantes (GIMENO-GARCÍA et al., 1996). Além disso, elementos essenciais (cobre, zinco, ferro, manganês e boro) ao crescimento de cultivos são normalmente adicionados ao solo para remediar deficiências (VIEIRA et al., 2016).

Em *L. anus* foram verificados parasitos intestinais vermiformes. Essa informação não foi considerada nos dois artigos uma vez que a infestação ocorreu de modo contínuo durante todas as coletas. Os endoparasitas podem causar efeitos sinérgicos ou antagônicos nos hospedeiros. Eles podem enfraquecer seu sistema imunológico aumentando os efeitos negativos dos poluentes ou podem diminuir as concentrações de poluentes disponíveis para os tecidos do hospedeiro (LANDSBERG et al., 1998). Metais pesados são frequentemente complexados com sais biliares e, como alguns parasitas intestinais não possuem vias básicas para a síntese de esteroides e ácidos graxos, eles acabam impedindo a reabsorção de metais não essenciais pelo hospedeiro (SURES, 2006). Dessa forma, os parasitos intestinais poderiam exercer um efeito

benéfico a *L. anus* ao retirar da circulação metais pesados que poderiam causar danos.

Peixes apresentam um alto potencial de plasticidade adaptativa (LUSHCHAK, 2016). Estresse ambiental em baixas concentrações de poluentes que peixes enfrentam pode ajudar a moldar seus sistemas ecológicos, evolutivos ou biológicos (PADMINI, 2010), adaptando-se àquelas condições.

No Capítulo 2, ficou claro a diferença na atividade da enzima AChE especialmente em tecido cerebral de *L. anus* comparando-se verão e inverno. Esta alteração pode ser normal em função da variação dos fatores abióticos mas pode estar refletindo uma exposição a xenobióticos durante épocas de culturas agrícolas específicas (e.g. apenas no inverno ocorre o plantio de trigo). AChE é uma das enzimas bioindicadoras de neurotoxicidade e o desvio da sua função normal implica em alterações no sistema neuro-motor dos peixes. Alteração de padrões de comportamento, uma das consequências da alteração da AChE a longo prazo, implica em sérios riscos ao sucesso de populações de peixes (SCOTT & SLOMAN, 2004). Além disso, a exposição de longo prazo a poluentes pode impactar o fitness das populações (crescimento, fecundidade, qualidade e viabilidade dos gametas) e, dessa forma, pode haver muitas gerações de exposição química antes das populações de peixes reduzirem substancialmente (HAMILTON et al., 2015). No Capítulo 3, através da análise de redundância, as múltiplas variáveis preditoras (bioquímicas) e respostas (abióticas, pesticidas, metais) foram compiladas em um único gráfico para entendermos suas relações. Tanto para *Geophagus brasiliensis*, e especialmente para *L. anus*, a sazonalidade foi a variável mais significativa. A sazonalidade impõe flutuações em todos os fatores abióticos (especialmente temperatura) bem como no registro de pesticidas, que variam de acordo com a cultura agrícola.

Poluentes podem causar efeitos nos indivíduos que não são aparentes até que ocorram mudanças a nível de população ou ecossistema, mais difíceis de remediar (LINDE-ARIAS et al., 2008). A exposição química pode diminuir a capacidade dos organismos de responder às mudanças ambientais uma vez que ativar sistemas de defesa tem um alto custo energético (MARCHAND et al., 2004; BEAULIEU & COSTANTINI, 2014; GANDAR et al., 2017).

Além dos efeitos diretos que poluentes podem causar aos peixes, efeitos indiretos podem resultar em desequilíbrio ecossistêmico e perturbação da teia alimentar. Por exemplo, dos pesticidas detectados na água do reservatório Passo Real, azoxistrobina, que inibe a respiração mitocondrial de fungos ao bloquear a transferência de elétrons entre o citocromo b e o c1, mostrou-se capaz de alterar a estrutura da comunidade de zoo e fitoplâncton além de consumidores primários em um microcosmo aquático (GUSTAFSSON et al., 2010). Já a atrazina é capaz de reduzir os organismos aquáticos fotossintetizantes (GIDDINGS et al., 2005; SOLOMON et al., 2008). Crustáceos e insetos aquáticos são sensíveis a exposição ao inseticida imidacloprido (SMIT et al., 2015). Assim, mesmo que não haja efeitos diretos, indiretamente as populações de peixes podem ser afetadas em função da redução de recursos alimentares (GIBBONS et al., 2015).

Por fim, a maioria dos programas de monitoramento ambiental que avaliam a qualidade

da água de reservatórios de hidrelétricas consiste em análises limnológicas físicas e químicas em água e sedimento e a avaliação da fauna restringe-se ao levantamento da diversidade de espécies (SAKURAGUI et al., 2013). Resultados de biomonitoramento ambiental, como os obtidos nesse estudo, podem ser subsídios para programas de conservação e leis regulatórias (BRITO et al., 2012). Considerando os recursos hídricos, a legislação brasileira carece de muitos dados sobre as concentrações máximas seguras para muitos tipos de pesticidas que são liberados para uso em áreas agrícolas e domiciliares. Dentre os pesticidas detectados nesse estudo, apenas atrazina e simazina (ambas  $2 \mu\text{gL}^{-1}$ ) constam na lista da Resolução 357 de 2005 do CONAMA para água de consumo. Outro viés da legislação brasileira é a falta de informações específicas sobre o uso de organismos em testes de ecotoxicologia para avaliação da qualidade da água (DALZUCHIO et al., 2016).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Este capítulo apresenta as conclusões do trabalho desenvolvido e as sugestões para trabalhos futuros. Além disso, a produção científica resultante deste trabalho é listada.*

### 5.1 CONCLUSÕES GERAIS

A comparação dos dados bioquímicos de verão e de inverno em *L. anus* no Artigo 1 possibilitou perceber que o fator temperatura pode exercer forte influência nas respostas dos biomarcadores.

A análise multivariada realizada no Artigo 2 proporcionou uma visão integrada de todos os fatores avaliados (respostas bioquímicas, pesticidas, metais, parâmetros físico-químicos). Ficou claro o efeito do fator sazonalidade sob as respostas dos biomarcadores.

Em relação aos pesticidas, apesar da baixa concentração, estes podem estar causando alterações nos biomarcadores além do normal da variação sazonal e/ou causando desvios energéticos que podem se manifestar negativamente a longo prazo.

Infelizmente não há um local com menor poluição no reservatório Passo Real (por se tratar de um corpo d'água fechado) para considerar como controle e comparar com os demais pontos. Neste caso, seria pertinente um monitoramento de longo prazo para poder verificar as consequências da exposição destas espécies à complexa mistura de poluentes que estão (e continuarão) presentes no reservatório. Além disso, uma investigação da relação da temperatura (baixas e altas, simulando as variações ambientais ao longo das estações) e os biomarcadores de toxicidade em condições controladas de laboratório seria interessante para compreender os efeitos isolados desse fator e discriminar daqueles causados por poluentes.

Outro ponto a ser considerado é aliar o desenvolvimento econômico com a proteção ambiental, buscando alternativas mais benéficas para o manejo agrícola tanto para o meio ambiente quanto para o próprio homem.

### 5.2 TRABALHOS FUTUROS

Em função da relevância da sazonalidade para os resultados encontrados nesta tese, pretende-se realizar um estudo para analisar o efeito de diferentes temperaturas (baixas e altas) sob biomarcadores comumente utilizados em estudos de toxicidade de poluentes aquáticos tendo como organismo modelo a espécie de peixe *Rhamdia quelen*, amplamente utilizada como modelo experimental em laboratório e que apresenta maior proximidade evolutiva e hábitos semelhantes com a espécie *Loricariichthys anus*. Um sistema de controle de temperatura já

foi desenvolvido e é baseado em células de Peltier (bombas de calor termoelétricas capazes de transferir calor de uma superfície à outra através de uma junção semicondutora). Ao monitorar a temperatura da água e do ambiente, o sistema de controle em malha fechada atua regulando a quantidade de energia fornecida às bombas de calor de forma a manter a temperatura do tanque de experimentação constante em um valor pré-determinado. Além disso, o sistema de controle conta com interface de comunicação serial de forma a viabilizar o monitoramento e controle remoto do sistema, eliminando a necessidade de monitoramento presencial constante.

### 5.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Ao longo do doutorado, foram publicados os seguintes artigos científicos relacionados diretamente ao tema da tese e de trabalhos paralelos desenvolvidos concomitantemente ao período. Além disso, o manuscrito apresentado no Capítulo 3 está em processo de submissão a um periódico internacional.

#### 5.3.1 Artigos Completos Publicados em Periódicos

- **AMARAL, A. M. B.**; GOMES, J. L. C.; WEIMER, G. H.; MARINS, A. T.; LORO, V. L.; ZANELLA, R. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, v. 191, p. 876-885, 2018.
- NUNES, M. E. M.; MÜLLER, T. E.; MURUSSI, C.; **AMARAL, A. M. B.**; GOMES, J. L. C.; MARINS, A. T.; LEITEMPERGER, J.; RODRIGUES, C. C. R.; FIUZA, T. L.; COSTA, M. D.; SEVERO, E. S.; ROSEMBERG, D. B.; LORO, V. L. Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish - A comparative study. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 206-7, p. 48-53, 2018.
- FIUZA, T. L.; LEITEMPERGER, J.; SEVERO, E. S.; MARINS, A. T.; **AMARAL, A. M. B.**; PEREIRA, M. E.; LORO, V. L. Effects of diphenyl diselenide diet on a model of mercury poisoning. **Molecular Biology Reports**, v. 45, p. 2631-2639, 2018.
- GONÇALVES, C. R.; MARINS, A. T.; **AMARAL, A. M. B.**; LEITEMPERGER, J.; SEVERO, E. S.; MORAES, B. S.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 100, p. 1-5, 2018.

### 5.3.2 Trabalhos Publicados em Anais de Congressos

- FIUZA, T. L.; LEITEMPERGER, J.; GUERRA, L. J.; SEVERO, E. S.; MARINS, ALINE T.; AMARAL, A. M. B.; CEREZER, C.; PELLEGRIN, D.; NENE, G. S. F.; NUNES, M. E. M.; SOUZA, R. R. M.; LORO, V. L. Avaliação dos efeitos da dieta suplementada com disseleneto de difenila em jundiás expostos ao cloreto de mercúrio. In: **I Simpósio Gaúcho de Toxicologia e Saúde Ambiental**, 2018, Rio Grande. Anais, 2018.
- CEREZER, C.; FERREIRA, B. C.; AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J. W.; LORO, V. L.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; SANTOS, S. Effect of water temperature on the oxidizing parameters of *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). In: **SETAC Latin America 12th Biennial Meeting**, 2017, Santos. ABSTRACT BOOK, 2017.
- CEREZER, C.; FERREIRA, B. C.; AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J. W.; MARINS, A. T.; LORO, V. L.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; SANTOS, S. Poor quality of water causes biochemical and behavioral changes in *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). In: **SETAC Latin America 12th Biennial Meeting**, 2017, Santos. ABSTRACT BOOK, 2017.
- MARINS, A. T.; RODRIGUES, C. C. R.; MENEZES, C. C.; GOMES, J. L. C.; COSTA, M. D.; NUNES, M. E. M.; LEITEMPERGER, J. W.; MULLER, T. E.; SEVERO, E. S.; AMARAL, A. M. B.; GUERRA, L. J.; FIUZA, T. L.; LORO, V. L. Dieta Suplementada com Disseleneto de Difenila Previne Alterações Bioquímicas em Carpas (*Cyprinus Carpio*) Expostas a Atrazina. In: **XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 2016, Curitiba. Anais, 2016.
- SEVERO, E. S.; MURUSSI, C. R.; GUERRA, L. J.; NUNES, M. E. M.; MARINS, A. T.; MENEZES, C. C.; COSTA, M. D.; GOMES, J. L. C.; LEITEMPERGER, J. W.; MULLER, T. E.; AMARAL, A. M. B.; FIUZA, T. L.; MORAES, B. S.; LORO, V. L. Biomonitoramento do Rio Pinheirinho (Ibirubá, RS, Brasil) Utilizando *Geophagus Brasiliensis* (Cichlidae) Como Bioindicador. In: **XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 2016, Curitiba. Anais, 2016.
- WEIMER, G. H.; AMARAL, A. M. B.; FARIA, A. S.; GRESSLER, C. L.; PELLEGRIN, D.; FELIX, G. S.; MOURA, L. K.; MENEZES, K. E.; SOUZA, R. R. M.; LORO, V. L. Sazonal Variation of Toxicity Biomarkers in *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) Exposed to Agricultural Pollution. In: **UFSM-Joint Workshop of Neuropsychopharmacology, Toxicological Biochemistry and Behavioral Biology**, 2016, Santa Maria. Abstracts, 2016.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405-415, 2004.

ALBRECHT, M. P.; SILVEIRA, C. M. Alimentação de *Loricariichthys anus* (Teleostei; Loricariidae) nas lagoas Marcelino e Peixoto, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v. 13, n. 1, p. 79-85, 2001.

ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, p. 779-787, 2016.

ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. **Stream Ecology: Structure and Function of Running Waters**. Verlag: Springer Publishing, 2007. 400 p.

ALTENHOFEN, S.; NABINGER, D. D.; WIPRICH, M. T.; PEREIRA, T. C. B.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 483-490, 2017.

AMMAR, R.; KAZPARD, V.; WAZNE, M.; EL SAMRANI, A. G.; AMACHA, N.; SAAD, Z.; CHOU, L. Reservoir sediments: a sink or source of chemicals at the surface water-groundwater interface. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 9, p. 579, 2015.

ANA, Agência Nacional de Águas. **Panorama da qualidade das águas superficiais do Brasil/2012**. Brasília: ANA, 2012. 264 p.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 31 p. 2014.

BARRETO, S.; HERMAN, L.; GARIBOTTI, V. Levantamento dos agroquímicos usados no Estado do Rio Grande do Sul por Bacia Hidrográfica. **Boletim Epidemiológico**, v. 14, n. 2, p. 3-6, 2012.

BEAULIEU, M.; COSTANTINI, D. Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. **Conservation Physiology**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2014.

BERTACO, V. A.; FERRER, J.; CARVALHO, F. R.; MALABARBA, L. R. Inventory of the freshwater fishes from a densely collected area in South America - a case study of the current knowledge of Neotropical fish diversity. **Zootaxa**, v. 4138, n. 3, p. 401-440, 2016.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. 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**, v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.

BRITO, I. A.; FREIRE, C. A.; YAMAMOTO, F. Y.; ASSIS, H. C. S.; SOUZA-BASTOS, L. R.; CESTARI, M. M.; GHISI, N. C.; PRODOCIMO, V.; FILIPAK NETO, F.; RIBEIRO, C. A. O. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarkers evaluation in tropical fish. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, p. 615-625, 2012.

BRUSCHI, W. **Influência de despejos urbanos sobre a ictiofauna das lagoas costeiras Marcelino e Peixoto, Osório, RS**. 1998, 111 p. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1998.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Introdução. In: BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (Eds). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 11-15, 2007.

CARVALHO, C. S.; BERNUSSO, V. A.; DE ARAÚJO, H. S. S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FERNANDES, M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, p. 60-69, 2012.

CASEMIRO, F. A. S.; HAHN, N. S.; DELARIVA, R. L. Estrutura trófica da ictiofauna, ao longo do gradiente longitudinal do reservatório de Salto Caxias (rio Iguaçu, Paraná, Brasil) no terceiro ano após represamento. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 67-71, 2005.

CEEE-GT, Companhia Estadual de Geração e Transmissão de Energia Elétrica. **Plano de uso e ocupação do solo no entorno do reservatório da UHE Passo Real**. Porto Alegre: Profill, 2011.

CHRISTOFOLETTI, A. **Geomorfologia Fluvial**. São Paulo: Edgard Bücher, 1981.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 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**, Poder Executivo, Brasília, DF, p. 58-63, 2005.

COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S. The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. **Zootaxa**, v. 1462, p. 1-40, 2007.

DA ROCHA, A. M.; DE FREITAS, D. P. S.; BURNS, M.; VIEIRA, J. P.; DE LA TORRE, F. R.; MONSERRAT, J. M. Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil.

**Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, p. 512-520, 2009.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DALZUCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; PETRY, I. E.; GEHLEN, G.; SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, p. 283-298, 2016.

DE BRITTO, A. C. P.; ROCHA, C. B.; TAVARES, R. A.; FERNANDES, J. M.; PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F. Rendimento corporal e composição química do filé da viola (*Loricariichthys anus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 38-44, 2014.

DEFARGE, N.; VENDÔMOIS, J. S.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 156-163, 2018.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z-I.; NOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A-H.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163-182, 2006.

DUNLOP, R. A.; BRUNK, U. T.; RODGERS, K. J. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation. **IUBMB Life**, v. 61, p. 522-527, 2009.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p.81-128, 1991.

FERNANDES, D.; BEBIANNO, M. J.; PORTE, C. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two comercial fish species of the Northern Iberian Shelf. **Science of the Total Environment**, v. 391, p. 159-167, 2008.

GANDAR, A.; LAFFAILLE, P.; MARTY-GASSET, N.; VIALA, D.; MOLETTE, C.; JEAN, S. Proteome response of fish under multiple stress exposure: effects of pesticides mixtures and temperature increase. **Aquatic Toxicology**, v. 184, p. 61-77, 2017.

GARCIA, A. M.; HOEINGHAUS, D. J.; VIEIRA, J. P.; WINEMILLER, K. O.; MARQUES, D. M. L. M.; BEMVENUTI, M. A. Preliminary examination of food web structure of Nicola Lake (Taim Hydrological System, south Brazil) using dual C and N stable isotope analyses. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 279-284, 2006.

GARCIA, L. O.; COPATTI, C. E.; WACHHOLZ, F.; PEREIRA FILHO, W.; BALDISSE-ROTTA, B. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 2, p. 275-281, 2008.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; FÁVARO, L. F.; ASSIS, H. C. S.; PRIOLI, A. J. In situ assessment of a neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, p. 699-709, 2014.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; GUILOSKI, I. C.; LIMA, S. B.; ASSIS, H. C. S.; LONGHI, S. J.; PRIOLI, A. J. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: a field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1208-1218, 2017.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 103-118, 2015.

GIDDINGS, J. M.; ANDERSON, T. A.; HALL, L. W.; KENDALL, R. J.; RICHARDS, R. P.; SOLOMON, K. R.; WILLIAMS, W. M. **A probabilistic aquatic ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters**. Pensacola: SETAC Press, 2005. 432 pp.

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19-25, 1996.

GONÇALVES, C. R.; MARINS, A. T.; DO AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J.; SEVERO, E. S.; MORAES, B. S.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Biochemical responses in freshwater fish exposed to insecticide propoxur. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 100, n. 4, p. 524-528, 2018.

GUSTAFSSON, K.; BLIDBERG, E.; ELFGREN, I. K.; HELLSTRÖM, A.; KYLIN, H.; GOROKHOVA, E. Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 431-444, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 1999. 968 p.

HAMILTON, P. B.; COWX, I. G.; OLEKSIK, M. F.; GRIFFITHS, A. M.; GRAHN, M.; STEVENS, J. R.; CARVALHO, G. R.; NICOL, E.; TYLER, C. R. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals – a critical review. **Fish and Fisheries**, v. 3, n. 3, p. 545-566, 2015.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVIN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**

**Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, p. 537-556, 2002.

ITURBURU, F. G.; ZÖMISCH, M.; PANZERI, A. M.; CRUPKIN, A. C.; CONTARDO-JARA, V.; PFLUGMACHER, S.; MENONE, M. L. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1-10, 2016.

JARAMILLO-VILLA, U.; CARAMASCHI, E. P. Índices de integridade biótica usando peixes de água doce: uso nas regiões tropical e subtropical. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 442-462, 2008.

JOLLY, S.; BADO-NILLES, A.; LAMAND, F.; TURIES, C.; CHADILI, E.; PORCHER, J.-M.; BETOULLE, S.; SANCHEZ, W. Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus* sp., exposed to agricultural and urban environmental pressures: practical recommendations for experimental design. **Chemosphere**, v. 87, p. 675-683, 2012.

KIRBY, M. F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S. J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.

KULLANDER, S.O. Cichlidae (Cichlids). In: **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. (Eds), Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2003. p. 605-654.

LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; HEBERT, V. R.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon. **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 38-44, 2014.

LANDSBERG, J. H.; BLAKESLEY, B. A.; REESE, R. O.; MCRAE, G.; FORSTCHEN, P. R. Parasites of fish as indicators of environmental stress. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 51, p. 211-232, 1998.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; NOVO, L. A.; ALBURQUERQUE, C.; MOREIRA, J. C. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 974-979, 2008.

LORO, V. L.; MURUSSI, C.; MENEZES, C.; LEITEMPERGER, J.; SEVERO, E.; GUERRA, L.; COSTA, M.; PERAZZO, G. X.; ZANELLA, R. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 569-578, 2015.

LOUIZ, I.; HASSINE, O. K. B.; PALLUEL, O.; BEN-ATTIA, M.; AÏT-AÏSSA, S. Spatial and temporal variation of biochemical biomarkers in *Gobius niger* (Gobiidae) from a southern

Mediterranean lagoon (Bizerta lagoon, Tunisia): influence of biotic and abiotic factors. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, p. 305-314, 2016.

LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 711-747, 2016.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13-30, 2011.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, p. 36-41, 2006.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários – AGROFIT**, 2016.

MARCHAND, J.; QUINIOU, L.; RISO, R.; THEBAUT, M-T, LAROCHE, J. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 4, p. 327-343, 2004.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p. 75-88, 2005.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, 294-299, 2010.

NASCIMENTO, A. A.; ARAÚJO, F. G.; GOMES, I. D.; MENDES, R. M. M.; SALES, A. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in an eutrophized tropical River in South-Eastern Brazil. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 41, p. 209-216, 2012.

NIMET, J.; GUIMARÃES, A. T. B.; DELARIVA, R. L. Use of muscular cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a biomarker in biomonitoring of rural streams. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, p. 232-238, 2017.

OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, A. C. B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F. Y.; PHILIPPI, V. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; NETO, F. F.; CESTARI, M. M.; DE ASSIS, H. C. S.; RIBEIRO, C. A. O. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145-9160, 2014.

PADMINI, E. Physiological adaptations of stressed fish to polluted environments: role of heat shock proteins. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 206, p. 1-27, 2010.

PAVLOVIĆ, S. Z.; MITIĆ, S. S. B.; RADOVANOVIĆ, T. B.; PERENDIJA, B. R.; DESPOTOVIĆ, S. G.; GAVRIĆ, J. P.; SAIČIĆ, Z. S. Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 413-428, 2010.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996.

PEREIRA, S.; PINTO, A. L.; CORTES, R.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; COIMBRA, A. M.; MONTEIRO, S. M. Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 157-166, 2013.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E. C.; PASSOS, V. M. Estudo do cascudo *Loricariichthys platymetopon* (Isbrucker & Nijssen, 1979) (Siluriforme, Loricariidae) visando seu aproveitamento comercial, na região de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 2/3, n. 1, p. 27-31, 1996.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 92, n. 3, p. 79-84, 2002.

QUINN, A. L.; RASMUSSEN, J. B.; HONTELA, A. Physiological stress response of Mountain Whitefish (*Prosopium williamsoni*) and White Sucker (*Catostomus commersoni*) sampled along a gradient of temperature and agrichemicals in the Oldman River, Alberta. **Environmental Biology of Fishes**, v. 88, p. 119-131, 2010.

RADI, A. A. R.; HAY, D. Q.; MATOKOVICS, B.; GABRIELAK, T. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behavior. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 81, n. 2, p. 395-399, 1985.

RAUTENBERG, G. E.; AMÉ, M. V.; MONFERRÁN, M. V.; BONANSEA, R. I.; HUED, A. C. A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquía River. **Ecological Indicators**, v. 48, p. 706-720, 2015.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, 2003.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L. Three new species of the Loricariid catfish genus *Loricariichthys* (Teleostei: Siluriformes) from Southern South America. **Copeia**, v. 4, p. 1029-1047, 2000.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

ROMANI, R.; ANTOGNETTI, C.; BALDRACCHINI, F.; DE SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, n. 3, p. 321-329, 2003.

ROSSATO, M. S. **Os climas do Rio Grande do Sul: variabilidade, tendências e tipologia**. 2011, 240 f. Tese de doutorado (Doutorado Geografia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

RUTTKAY-NEDECKY, B.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. The role of metallothionein in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 6044-6066, 2013.

SAKURAGUI, M. M.; PAULINO, M. G.; PEREIRA, C. D. S.; CARVALHO, C. S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 41-51, 2013.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.

SEMA, SECRETARIA DO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. **Serviços e informações: Bacia Hidrográfica do Rio Alto Jacuí**. Disponível em: [www.sema.rs.gov.br](http://www.sema.rs.gov.br).

SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; FONSECA, V. F.; FRANÇA, S.; VASCONCELOS, R. P.; BEBIANNO, M. J.; CABRAL, H. N. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. **Ecological Indicators**, v. 19, p. 215-225, 2012.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxico e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400 p.

SMIT, C. E.; POSTHUMA-DOODEMAN, C. J. A. M.; VAN VLAARDINGEN, P. L. A.; DE JONG, F. M. W. Ecotoxicity of imidacloprid to aquatic organisms: derivation of water quality standards for peak and long-term exposure. **Human and Ecological Assessment**, v. 21, 1608-1630, 2015.

SOLOMON, K. R.; CARR, J. A.; DU PREEZ, L. H.; GIESY, J. P.; KENDALL, R. J.; SMITH, E. E.; VAN DER KRAAK, G. J. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, p. 721-772, 2008.



STOLIAR, O. B.; LUSHCHAK, V. I. Environmental pollution and oxidative stress in fish. In: LUSHCHAK, V. I. (Ed.). **Oxidative Stress Environmental Induction and Dietary Antioxidants**. 1 ed. Rijeka: InTech Europe, 2012. cap. 7, p. 131-166.

STORELLI, C.; ACIERNO, R.; MAFFIA, M. Membrane lipid and protein adaptations in Antarctic fish. In: PÖRTNER, H. O.; PLAYLE, R. (Eds.). **Cold Ocean Physiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 166-189.

SURES, B. How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. **Journal of Helminthology**, v. 80, p. 151-157, 2006.

TIERNEY, K. B.; KENNEDY, C. J.; GOBAS, F.; GLEDHILL, M.; SEKELA, M. Organic contaminants and fish. In: TIERNEY, K. B.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Organic Chemical Toxicology of Fishes**. 1 ed. London: Academic Press, 2013. cap. 1, p. 1-52.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TOPAL, A.; ALAK, G.; OZKARACA, M.; YELTEKIN, A. C.; COMAKLI, S.; ACIL, G.; KOKTURK, M.; ATAMANALP, M. 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**, v. 175, p. 186-191, 2017.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006.

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

VASCONCELOS, F. C. W.; NÓBREGA, J. C. A.; GUERREIRO, M. C.; JESUS, E. A.; JULIÃO, L. G. F.; CURI, N. Mobilidade do herbicida atrazina em amostras de latossolos vermelhos sob calagem e adubação fosfatada. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, p. 133-146, 2008.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 281-300, 2007.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. R. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 598-609, 2017.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDELLI, B.; OLIVEIRA, L. F.; CABRERA, L. C.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C. B. R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, v. 23, p. 274-279, 2012.

WACHHOLZ, F. **Influência da bacia hidrográfica e características espaço-temporais de variáveis limnológicas sobre reservatórios no Rio Jacuí – RS**. 2011, 196 f. Tese (Doutorado Geografia) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2011.

WIDMER, R.; ZIAJA, I.; GRUNE, T. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. **Free Radical Research**, v. 40, p. 1259-1268, 2006.

WILHELM-FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. I. Influence of season and pollution on antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WUNDERLICH, A. C.; SILVA, R. J.; ZICA, É. O. P.; REBELO, M. F.; PARENTE, T. E. M.; VIDAL-MARTÍNEZ, V. M. The influence of seasonality, fish size and reproductive status on EROD activity in *Plagioscion squamosissimus*: implications for biomonitoring of tropical/sub-tropical reservoirs. **Ecological Indicators**, v. 58, p. 267-276, 2015.

XING, H.; WANG, J.; LI, J.; FAN, Z.; WANG, M.; XU, S. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 26-30, 2010.

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; SANTOS, G. S.; STREMEL, T. R. O.; DORIA, H. B.; GUSSO-CHOUERI, P.; CAMPOS, S. X.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; CESTARI, M. M.; FILIPAK NETO, F.; AZEVEDO, J. C. R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçú River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18111-18128, 2016.

ZIANI, P.; FOLETO, E. M.; WOLLMANN, C. A. Analysis and geographic characterization of Hydrographic Basin of Alto Jacuí/RS. **Ciência e Natura**, v. 39, p. 58-74, 2017.

## APÊNDICE A – TABELAS DE DADOS DO ARTIGO 2

Tabela A.1 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de *Loricariichthys anus* nas estações verão (ve) e outono (ou) (PROT – proteína em mg/mL; CAT – catalase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; AChE – acetilcolinesterase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; GST – glutathione-S-transferase em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB/min/mg de proteína; TNP – tióis não preteicos em  $\mu\text{mol}$  de SH por g de tecido; TBARS – peroxidação lipídica em nmol/ g de tecido; CARB – carbonilação de proteínas em nmol/mg de proteína; MET – metalotioneínas em  $\mu\text{mol}$  de SH/ g de tecido) e abióticos (temp – temperatura em °C, od – oxigênio dissolvido em mg/L, ce – condutividade elétrica em mS/cm, POR – potencial de oxidação/redução em mV, NTU – turbidez, Nit – nitrito em mg/mL, Amo – amônia em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , Atz – atrazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Imd – imidacloprido em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Azx – azoxistrobina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Ppx – propoxur em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Smz – simazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) (média de n = 3 por ponto). Metais expressos em mg/L. Células em branco correspondem a falha do equipamento.

	1ve	2ve	3ve	4ve	5ve	6ve	1ou	2ou	3ou	4ou	5ou	6ou
PROTfi	4,6843	4,6091	4,5045	4,7840	5,0587	5,4134	3,5055	4,2008	3,9610	3,1320	3,0795	2,5655
PROTbr	1,6833	1,9225	1,7861	1,5433	1,6688	1,7319	1,5990	1,9250	1,7640	1,5165	1,6455	1,7440
PROTce	1,9837	2,1218	1,9735	1,8874	2,3008	1,9516	1,6155	2,1233	1,8825	1,8950	1,9695	2,2350
PROTmu	2,1887	2,2263	2,6889	2,3507	2,6397	2,8721	2,0561	2,0515	2,2797	1,7122	1,7827	2,1789
CATfi	0,6556	0,5859	0,6088	0,4360	0,5217	0,4420	0,4090	0,3340	0,2546	0,3615	0,3972	0,3058
AChEce	0,3948	0,4473	0,4127	0,4249	0,3907	0,3819	1,0714	0,7946	1,2300	1,0911	1,6472	1,1633
AChEmu	0,0475	0,0622	0,0546	0,0538	0,0490	0,0543	0,1283	0,2435	0,1587	0,1610	0,1503	0,2212
GSTfi	0,0421	0,0218	0,0257	0,0284	0,0326	0,0275	0,1239	0,0675	0,1186	0,0843	0,1014	0,1590
GSTbr	0,0655	0,0462	0,0467	0,0508	0,0536	0,0434	0,0500	0,0570	0,0753	0,0952	0,0811	0,0809
GSTce	0,0480	0,0395	0,0397	0,0498	0,0421	0,0503	0,0758	0,0442	0,0508	0,0548	0,0380	0,0502
GSTmu	0,0497	0,0454	0,0415	0,0432	0,0323	0,0352	0,0379	0,0399	0,0530	0,0414	0,0637	0,0426
NPSHfi	0,9741	0,9718	0,9540	0,9433	0,9399	0,9012	1,3511	1,3342	1,3390	1,3739	1,3496	1,3935
NPSHbr	1,0490	0,9567	1,0585	1,0701	1,0362	1,0791	1,4746	1,3837	1,3626	1,3764	1,2228	1,4737
NPSHce	1,0195	0,9685	0,9941	1,0170	1,0092	0,9545	1,1990	1,2291	1,0767	1,2310	1,1889	1,2013
TBARSfi	391,0728	459,9619	342,4472	312,3573	378,9513	307,7845	473,0832	523,9955	668,8928	517,8310	440,6307	408,7647
TBARSbr	322,4106	412,2439	583,1054	488,4025	464,8140	489,2402	542,5342	546,2340	547,7794	428,8205	566,3801	469,1127
TBARSce	216,4434	194,9000	226,3354	188,8244	319,5171	299,3869	116,0256	96,0796	123,5173	154,5557	113,6475	112,1068
TBARSmu	63,9669	63,5054	66,3894	56,2186	58,1508	59,4102	95,8283	95,2924	80,9567	74,0010	76,0776	81,6936
CARBfi	34,3528	37,5858	26,2456	9,5601	15,3195	7,4206	17,7459	25,2375	19,0651	30,1827	45,5379	18,6373
CARBbr	13,4128	16,5258	16,4134	13,1872	15,3328	17,1421	17,9956	18,1023	10,9208	15,4401	21,0259	14,1958
CARBce	5,4939	5,3354	5,0619	3,9625	5,9966	5,6948	10,6474	11,8578	7,4737	13,0469	9,0635	10,0052
CARBmu	12,7484	15,6358	17,1090	10,5091	9,4767	12,2832	12,6617	7,2132	9,5268	9,6447	9,8606	4,8183
METfi	9,2292	13,8246	14,2758	55,1834	30,6795	39,6407	6,3995	7,1697	9,4762	10,5814	11,0847	10,5759
temp	27	27	27	30	28	32				19	19	19
od	12,12	10,4	12,35	12,6	10,9	9,43				14,52	14,36	18,56
ce	0,053	0,049	0,052	0,053	0,049	0,047				0,052	0,051	0,048
POR	299	337	291	236	279	250				341	294	240
NTU	49,8	46,1	24,2	25,3	9,5	91,7				45,6	39,6	38,6
Nit	0,0139	0,0017	0,0011	0,0033	0,0039	0,0039	0,0238	0,0150	0,0012	0,0145	0,0138	0,0075
Amo	0,0138	0,0037	0,0049	0,0058	0,0055	0,0031	0,0119	0,0126	0,0122	0,0042	0,0145	0,0180
pH	6,9	6,3	7,2	8,4	7,6	8	5,7	6,1	6,2	7	8	6,6
Atz	0,510	0,560	0,410	0,230	0,250	0,210	0	0,001	0,001	0,030	0,040	0,050
Imd	0	0	0	0	0	0	0	0,040	0,050	0,020	0,001	0,040
Azx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ppx	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Smz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,024	0,030

(Continua)

Tabela A.1 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de *Loricariichthys anus* nas estações verão (ve) e outono (ou) (PROT – proteína em mg/mL; CAT – catalase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; AChE – acetilcolinesterase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; GST – glutationa-S-transferase em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB/ $\text{min}/\text{mg}$  de proteína; TNP – tióis não preoteicos em  $\mu\text{mol}$  de SH por g de tecido; TBARS – peroxidação lipídica em nmol/ g de tecido; CARB – carbonilação de proteínas em nmol/mg de proteína; MET – metalotioneínas em  $\mu\text{mol}$  de SH/ g de tecido) e abióticos (temp – temperatura em  $^{\circ}\text{C}$ , od – oxigênio dissolvido em mg/L, ce – condutividade elétrica em mS/cm, POR – potencial de oxidação/redução em mV, NTU – turbidez, Nit – nitrito em mg/mL, Amo – amônia em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , Atz – atrazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Imd – imidacloprido em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Azx – azoxistrobina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Ppx – propoxur em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Smz – simazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) (média de n = 3 por ponto). Metais expressos em mg/L. Células em branco correspondem a falha do equipamento.

(Continuação)

Al	2,55	2,38	1,89	2,15	1,6	1,89	2,85	2,45	1,77	2,1	1,58	1,77
Pb	0,077	0,045	0,44	0,088	0,058	1,2	0,0089	0,088	0,057	0,092	0,077	1,15
Cd	0,98	0,88	0,68	0,7	0,62	0,88	0,78	0,77	0,65	0,68	0,67	0,87
Cu	0,35	0,48	0,57	0,5	0,56	0,65	0,38	0,55	0,58	0,48	0,6	0,72
Mn	0,87	0,95	1,17	0,85	1,17	0,95	0,77	0,87	1,12	0,87	1,15	0,98
Hg	0,0089	0,0077	0,089	0,0077	0,088	0,0089	0,0077	0,0089	0,099	0,0088	0,0092	0,0095
Fe	1,05	0,98	1,25	1,07	1,15	1,07	1,15	0,93	1,17	1,17	1,17	1,08

Fonte: Autora.

Tabela A.2 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de *Loricariichthys anus* nas estações inverno (in) e primavera (pr) (PROT – proteína em mg/mL; CAT – catalase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; AChE – acetilcolinesterase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; GST – glutationa-S-transferase em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB/min/mg de proteína; TNP – tióis não proteicos em  $\mu\text{mol}$  de SH por g de tecido; TBARS – peroxidação lipídica em nmol/ g de tecido; CARB – carbonilação de proteínas em nmol/mg de proteína; MET – metalotioneínas em  $\mu\text{mol}$  de SH/ g de tecido) e abióticos (temp – temperatura em °C, od – oxigênio dissolvido em mg/L, ce – condutividade elétrica em mS/cm, POR – potencial de oxidação/redução em mV, NTU – turbidez, Nit – nitrito em mg/mL, Amo – amônia em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , Atz – atrazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Imd – imidacloprido em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Azx – azoxistrobina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Ppx – propoxur em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Smz – simazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) (média de n = 3 por ponto). Metais expressos em mg/L. Células em branco correspondem a falha do equipamento.

	1in	2in	3in	4in	5in	6in	1pr	2pr	3pr	4pr	5pr	6pr
PROTfi	1,4640	1,5492	1,3944	1,4184	1,5864	1,4880	5,7232	5,5702	5,8109	5,8305	5,6188	6,2314
PROTbr	2,3546	1,8904	2,2463	1,9570	2,5155	2,0811	2,6303	2,5179	2,6702	2,4251	2,5977	3,0204
PROTce	1,6720	1,7459	1,8849	1,6737	1,9342	1,6945	2,1351	2,4802	2,4433	2,1982	2,3998	2,9065
PROTmu	1,6142	2,0749	1,9826	2,0617	1,9988	2,4068	1,4736	1,5616	1,8044	2,0492	2,1612	2,1716
CATfi	0,5275	0,6616	0,5878	0,7385	0,6133	0,6221	0,2789	0,3261	0,2795	0,2979	0,1660	0,1970
AChEce	0,8427	0,7856	0,7025	0,6083	0,5426	0,7276	1,3519	0,8610	1,4277	1,0265	1,0507	1,1887
AChEmu	0,1088	0,0889	0,2444	0,1904	0,0982	0,0949	0,1005	0,1142	0,0995	0,1359	0,0902	0,1182
GSTfi	0,4604	0,5583	0,4991	0,5319	0,6558	0,3386	0,2058	0,2107	0,2262	0,2012	0,1566	0,2624
GSTbr	0,0431	0,0481	0,0395	0,0394	0,0209	0,0281	0,0920	0,1064	0,1165	0,1166	0,1273	0,0973
GSTce	0,0521	0,0414	0,0364	0,0302	0,0439	0,0498	0,1398	0,1059	0,1178	0,1136	0,1111	0,1003
GSTmu	0,0708	0,0440	0,0584	0,0723	0,0368	0,0653	0,0887	0,1128	0,1014	0,0825	0,0911	0,0745
NPSHfi	1,0393	0,9907	0,9151	0,9125	0,9846	0,9286	1,1453	1,1550	1,1293	1,1770	1,0799	1,0602
NPSHbr	1,0567	0,9597	1,0029	0,9615	0,9897	1,0026	1,1369	1,1155	1,1181	1,1776	1,1283	1,1701
NPSHce	1,1141	1,0191	1,0698	1,0323	1,0084	1,0184	0,9733	1,0400	1,0379	1,1752	1,0194	1,1727
TBARSfi	288,8248	320,9239	389,1191	330,7490	323,8603	430,1836	316,8295	479,3771	501,1362	464,3933	723,7132	620,4432
TBARSbr	374,6941	207,6448	334,6791	211,9210	199,4833	233,7930	409,7599	464,5654	450,4422	153,4178	431,5072	574,4888
TBARSce	154,2878	202,3415	182,9369	216,4763	202,8886	178,7277	223,0426	183,7774	140,9200	195,9453	195,2393	228,7390
TBARSmu	101,6453	91,1614	138,8355	93,4167	90,2571	103,3870	131,1707	64,7417	75,8028	65,7416	68,1788	72,8032
CARBfi	29,5969	23,3847	34,0921	40,2972	33,0678	53,6687	29,7630	29,2233	42,9529	45,9050	48,7684	61,0817
CARBbr	25,2749	30,6626	50,0797	65,5192	28,7600	34,5413	44,7678	71,1768	46,5522	59,0838	78,0247	83,4547
CARBce	10,2659	11,6267	7,6704	8,5844	8,5902	8,3323	16,0657	19,1324	3,2775	11,9186	9,2520	13,2933
CARBmu	69,8158	10,0189	11,8652	17,2243	17,6283	15,8367	9,3946	6,4424	6,9050	7,5268	7,0744	8,5471
METfi	8,4952	8,2487	8,9374	8,8059	8,7911	9,5702	7,8896	6,9946	8,0271	7,4258	6,2836	5,8872
temp	17	16	15	15	16	15	27	27	25	22	24	23
od	12,33	11,4	11,69	14,54	14,68	13,35	11,97	9,5	11,92	12,41	20,19	11,13
ce	0,052	0,045	0,048	0,048	0,047	0,044	0,052	0,047	0,049	0,047	0,05	0,045
POR	300	306	330	332	319	338	310	300	269	323	279	320
NTU	73	52,4	29,2	27,1	21,2	16,5	33,2	34,1	48,6	36,4	22,2	12,1
Nit	0,0145	0,0213	0,0175	0,0145	0,0039	0,0037	0,0348	0,0429	0,0405	0,0266	0,0209	0,0243
Amo	0,0036	0,0017	0,0031	0,0042	0,0073	0,0062	0,0124	0,0237	0,0350	0,0260	0,0158	0,0181
pH	6,9	6,9	6,7	6,5	6,5	6	7,9	8,2	8,8	7,9	8,5	7,3
Atz	0,030	0,020	0,030	0,020	0,030	0,030	0,190	0,540	0,380	0,400	0,170	0,300
Imd	0,020	0,030	0,020	0,040	0,001	0	0	0,001	0,001	0,001	0	0
Azx	0	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,030	0,020	0,020	0,030	0,030
Ppx	0,020	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,030	0,030	0,040	0,001	0,040	0,030
Smz	0	0	0,001	0	0,001	0,001	0,070	0,160	0,120	0,160	0,090	0,110

(Continua)

Tabela A.2 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de *Loricariichthys anus* nas estações verão (ve) e outono (ou) (PROT – proteína em mg/mL; CAT – catalase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; AChE – acetilcolinesterase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; GST – glutathione-S-transferase em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB/min/mg de proteína; TNP – tióis não preteicos em  $\mu\text{mol}$  de SH por g de tecido; TBARS – peroxidação lipídica em nmol/ g de tecido; CARB – carbonilação de proteínas em nmol/mg de proteína; MET – metalotioneínas em  $\mu\text{mol}$  de SH/ g de tecido) e abióticos (temp – temperatura em  $^{\circ}\text{C}$ , od – oxigênio dissolvido em mg/L, ce – condutividade elétrica em mS/cm, POR – potencial de oxidação/redução em mV, NTU – turbidez, Nit – nitrito em mg/mL, Amo – amônia em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , Atz – atrazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Imd – imidacloprido em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Azz – azoxistrobina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Ppx – propoxur em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Smz – simazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) (média de n = 3 por ponto). Metais expressos em mg/L. Células em branco correspondem a falha do equipamento.

(Continua)

Al	1,88	2,38	1,78	1,85	1,55	1,67	2,37	2,55	1,65	1,93	1,45	1,55
Pb	0,077	0,095	0,059	1,05	0,089	1,07	0,087	0,085	0,055	1,15	0,087	1,05
Cd	0,65	0,82	0,6	0,77	0,68	0,85	0,58	0,75	0,55	0,88	0,65	0,9
Cu	0,47	0,58	0,49	0,55	0,58	0,7	0,58	0,55	0,52	0,65	0,55	0,77
Mn	0,92	0,88	1,1	0,95	1,05	0,9	1,15	0,92	1,1	0,9	1,05	0,92
Hg	0,0089	0,0077	0,089	0,0078	0,0087	0,0098	0,078	0,008	0,088	0,0088	0,0098	0,0088
Fe	1,27	0,9	1,15	1,07	1,07	1,18	1,17	0,85	0,98	1,15		1,07

Fonte: Autora.

Tabela A.3 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de *Geophagus brasiliensis* nas estações verão (ve) e outono (ou) (PROT – proteína em mg/mL; CAT – catalase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; AChE – acetilcolinesterase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; GST – glutathione-S-transferase em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB/min/mg de proteína; TNP – tióis não preteicos em  $\mu\text{mol}$  de SH por g de tecido; TBARS – peroxidação lipídica em nmol/ g de tecido; CARB – carbonilação de proteínas em nmol/mg de proteína; MET – metalotioneínas em  $\mu\text{mol}$  de SH/ g de tecido) e abióticos (temp – temperatura em  $^{\circ}\text{C}$ , od – oxigênio dissolvido em mg/L, ce – condutividade elétrica em mS/cm, POR – potencial de oxidação/redução em mV, NTU – turbidez, Nit – nitrito em mg/mL, Amo – amônia em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , Atz – atrazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Imd – imidacloprido em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Azx – azoxistrobina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Ppx – propoxur em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Smz – simazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) (média de n = 3 por ponto). Metais expressos em mg/L. Células em branco correspondem a falha do equipamento.

	1ve	2ve	3ve	4ve	5ve	6ve	1ou	2ou	6ou
PROTfi	3,2726	3,7784	2,0938	2,9956	2,6500	2,8654	2,7835	2,7835	3,1035
PROTbr	1,5671	1,6053	1,9447	1,6952	2,3906	1,7665	2,3715	2,3715	2,1495
PROTce	1,8471	1,8327	2,1511	2,5714	2,9014	2,7668	2,4092	2,8457	2,4990
PROTmu	2,3076	2,6513	2,5769	2,9534	2,9650	2,6869	2,6465	2,6955	1,7859
CATfi	0,1809	0,3393	0,4141	0,4535	0,5310	0,5712	0,4207	0,4111	0,3730
AChEce	0,8325	0,7292	0,3984	0,3061	0,3246	0,2256	0,4597	0,2307	0,3723
AChEmu	0,1150	0,3383	0,4053	0,3518	0,2984	0,4528	0,1507	0,2074	0,1923
GSTfi	0,0604	0,0406	0,0651	0,0451	0,0510	0,0718	0,2447	0,3135	0,1651
GSTbr	0,0596	0,0484	0,0415	0,0446	0,0319	0,0465	0,0518	0,0502	0,0586
GSTce	0,0454	0,0359	0,0399	0,0341	0,0256	0,0325	0,0475	0,0256	0,0249
GSTmu	0,0341	0,0256	0,0322	0,0247	0,0307	0,0334	0,0178	0,0356	0,0390
NPSHfi	1,0009	0,9945	0,9568	1,0004	0,9136	0,9729	1,3162	1,3318	1,3513
NPSHbr	1,1181	1,0877	1,0782	1,0481	1,0405	1,0638	1,3074	1,3200	1,3223
TBARSfi	266,8210	618,2045	430,8320	416,0750	370,9838	210,3326	631,6349	574,2648	1127,0525
TBARSbr	563,7232	333,2230	581,9011	745,1441	1000,2189	560,8957	603,0627	580,6042	623,0395
TBARSce	83,6453	113,8407	109,3416	110,6971	169,5785	105,6982	289,3049	330,0400	339,3907
TBARSmu	86,4428	77,8869	68,2832	70,5039	63,6304	106,8229	82,8771	75,4524	78,1766
CARBfi	4,8482	6,3030	5,3251	4,7636	6,1606	19,2075	16,1532	21,2501	29,6013
CARBbr	22,2375	16,4141	10,9277	38,2483	24,3750	24,4994	34,0520	28,7463	41,9472
CARBce	15,6247	10,6864	9,2788	6,7529	9,0029	8,6294	15,6406	26,5570	22,7383
CARBmu	8,1742	6,8330	5,4023	15,3616	11,6182	13,5434	10,7603	7,8819	6,9330
temp	27	27	27	30	28	32			19
od	12,12	10,4	12,35	12,6	10,9	9,43			18,56
ce	0,053	0,049	0,052	0,053	0,049	0,047			0,048
POR	299	337	291	236	279	250			240
NTU	49,8	46,1	24,2	25,3	9,5	91,7			38,6
Nit	0,0139	0,0017	0,0011	0,0033	0,0039	0,0039	0,0238	0,0150	0,0075
Amo	0,0138	0,0037	0,0049	0,0058	0,0055	0,0031	0,0119	0,0126	0,0180
pH	6,9	6,3	7,2	8,4	7,6	8	5,7	6,1	6,6
Atz	0,510	0,560	0,410	0,230	0,250	0,210	0,000	0,001	0,050
Imd	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040
Azx	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ppx	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Smz	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030
Al	2,550	2,380	1,890	2,150	1,600	1,890	2,850	2,450	1,770
Pb	0,077	0,045	0,440	0,088	0,058	1,200	0,009	0,088	1,150
Cd	0,980	0,880	0,680	0,700	0,620	0,880	0,780	0,770	0,870
Cu	0,35	0,48	0,57	0,5	0,56	0,65	0,38	0,55	0,72
Mn	0,87	0,95	1,17	0,85	1,17	0,95	0,77	0,87	0,98
Hg	0,0089	0,0077	0,089	0,0077	0,088	0,0089	0,0077	0,0089	0,0095
Fe	1,05	0,98	1,25	1,07	1,15	1,07	1,15	0,93	1,08

Fonte: Autora.

Tabela A.4 – Planilha de dados bioquímicos de quatro tecidos (fi – fígado, br – brânquias, ce – cérebro, mu – músculo) (média de n = 10 por ponto) de *Geophagus brasiliensis* nas estações inverno (in) e primavera (pr) (PROT – proteína em mg/mL; CAT – catalase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; AChE – acetilcolinesterase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; GST – glutathione-S-transferase em  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB/min/mg de proteína; TNP – tióis não proteicos em  $\mu\text{mol}$  de SH por g de tecido; TBARS – peroxidação lipídica em nmol/ g de tecido; CARB – carbonilação de proteínas em nmol/mg de proteína; MET – metalotioneínas em  $\mu\text{mol}$  de SH/ g de tecido) e abióticos (temp – temperatura em  $^{\circ}\text{C}$ , od – oxigênio dissolvido em mg/L, ce – condutividade elétrica em mS/cm, POR – potencial de oxidação/redução em mV, NTU – turbidez, Nit – nitrito em mg/mL, Amo – amônia em  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , Atz – atrazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Imd – imidacloprido em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Azx – azoxistrobina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Ppx – propoxur em  $\mu\text{g}/\text{L}$ , Smz – simazina em  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) (média de n = 3 por ponto). Metais expressos em mg/L. Células em branco correspondem a falha do equipamento.

	2in	3in	4in	5in	6in	2pr	3pr	4pr	5pr	6pr
PROTfi	3,9293	4,5668	4,8035	4,5050	5,8403	5,9769	4,9235	5,4665	5,1722	5,3440
PROTbr	3,1341	3,6665	3,4510	3,1536	3,4055	3,3444	3,3321	3,2806	3,2792	3,1037
PROTce	2,2784	2,1858	1,8802	2,0715	2,0638	1,9200	1,6268	1,5756	1,5293	1,5316
PROTmu	2,0043	1,9554	2,2971	2,3141	2,6091	1,8588	1,6804	1,5588	1,6157	1,7504
CATfi	0,1113	0,0793	0,1228	0,1733	0,1503	0,2233	0,2276	0,2230	0,1731	0,1387
AChEce	0,2776	0,1979	0,2219	0,1518	0,2354	1,1474	0,8299	0,7690	0,7723	0,6668
AChEmu	0,0874	0,0530	0,0653	0,0544	0,0944	0,0779	0,1382	0,0959	0,1087	0,1344
GSTfi	0,1731	0,0736	0,0690	0,1219	0,0546	0,2546	0,3156	0,3098	0,3387	0,3173
GSTbr	0,0381	0,0235	0,0203	0,0232	0,0252	0,1004	0,0979	0,0831	0,0871	0,0917
GSTce	0,0461	0,0327	0,0332	0,0362	0,0330	0,0835	0,1006	0,1072	0,1113	0,0996
GSTmu	0,0350	0,0221	0,0280	0,0384	0,0284	0,0824	0,0950	0,1096	0,0992	0,0981
NPSHfi	0,9076	1,0625	1,0203	0,9118	1,0028	1,179466	1,22314	1,239847	1,317528	1,260709
NPSHbr	1,0584	1,0043	1,0267	1,0243	1,0518	1,185741	1,126293	1,176158	1,177346	1,173529
TBARSfi	277,0682	366,4097	409,4616	323,6705	488,0290	496,4752	407,0992	605,3350	539,6074	498,7731
TBARSbr	121,5969	202,2075	240,6818	169,1706	189,1223	381,9510	283,9011	407,0728	310,7726	230,5329
TBARSce	89,4085	214,4889	175,3559	198,1770	207,9128	184,3519	142,1013	190,2882	182,8749	166,3493
TBARSmu	90,4692	99,4569	133,8448	90,2124	89,0624	82,1770	72,6157	68,4287	71,4283	66,7414
CARBfi	46,4017	32,0938	27,2931	39,8537	48,0554	15,5787	16,7506	25,2802	23,5786	17,9652
CARBbr	103,4709	59,3907	68,7231	19,6173	40,1986	17,8721	22,3450	24,4644	72,3246	41,5787
CARBce	6,2273	3,1120	8,4194	10,4407	5,5664	12,4318	6,1530	6,1035	19,1330	15,9294
CARBmu	4,4497	2,4752	4,8790	2,8856	2,8305	11,6850	6,3695	31,4577	6,4911	4,8607
temp	16	15	15	16	15	27	25	22	24	23
od	11,4	11,69	14,54	14,68	13,35	9,5	11,92	12,41	20,19	11,13
ce	0,045	0,048	0,048	0,047	0,044	0,047	0,049	0,047	0,05	0,045
POR	306	330	332	319	338	300	269	323	279	320
NTU	52,4	29,2	27,1	21,2	16,5	34,1	48,6	36,4	22,2	12,1
Nit	0,0213	0,0175	0,0145	0,0039	0,0037	0,0429	0,0405	0,0266	0,0209	0,0243
Amo	0,0017	0,0031	0,0042	0,0073	0,0062	0,0237	0,0350	0,0260	0,0158	0,0181
pH	6,9	6,7	6,5	6,5	6	8,2	8,8	7,9	8,5	7,3
Atz	0,020	0,030	0,020	0,030	0,030	0,540	0,380	0,400	0,170	0,300
Imd	0,030	0,020	0,040	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000
Azx	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,030	0,020	0,020	0,030	0,030
Ppx	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,030	0,040	0,001	0,040	0,030
Smz	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,160	0,120	0,160	0,090	0,110
Al	2,380	1,780	1,850	1,550	1,670	2,550	1,650	1,930	1,450	1,550
Pb	0,095	0,059	1,050	0,089	1,070	0,085	0,055	1,150	0,087	1,050
Cd	0,820	0,600	0,770	0,680	0,850	0,750	0,550	0,880	0,650	0,900
Cu	0,58	0,49	0,55	0,58	0,7	0,55	0,52	0,65	0,55	0,77
Mn	0,88	1,1	0,95	1,05	0,9	0,92	1,1	0,9	1,05	0,92
Hg	0,0077	0,089	0,0078	0,0087	0,0098	0,008	0,088	0,0088	0,0098	0,0088
Fe	0,9	1,15	1,07	1,07	1,18	0,85	0,98	1,15		1,07

Fonte: Autora.